

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mol.biologie a genetika eukaryot



**Bc. Lenka Kašíková**

Charakterizace kandidátních genů hybridní sterility *Hstx1* a *Hstx2*  
Characterization of the *Hstx1* and *Hstx2* hybrid sterility candidate genes

Diplomová práce

Školitel: Ing. Petr Jansa, CSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 5. 2015

Podpis

### **Poděkování:**

Děkuji Ing. Petru Jansovi, CSc. za trpělivé vedení a odbornou pomoc při zpracování této práce. Dále děkuji Prof. MUDr. Jiřímu Forejtovi, DrSc. za poskytnutí příležitosti tuto práci napsat a odbornou konzultaci v problematice hybridní sterility.

Děkuji Mgr. Václavu Gergelitsovi za odbornou pomoc při statistickém zpracování některých výsledků.

Můj nemalý dík patří také Mgr. Barboře Faltusové za jazykové korektury textu.

Za pomoc při zpracování obrázkových příloh děkuji svému příteli Ing. Janu Quiserovi.

Samozřejmě můj dík patří také všem kolegům za příjemné pracovní prostředí a rodině pak za podporu a pochopení po celou dobu psaní této práce.

## Abstrakt

Speciace, vznik nových druhů, je zásadním evolučním procesem zodpovědným za druhovou rozmanitost na naší planetě. Na počátku procesu speciace je oddělení dvou populací reprodukční bariérou, která zabrání genovému toku mezi nimi. Jedním z mechanismů, jak je docíleno reprodukční izolace, je hybridní sterilita (HS). Jedná se o mechanismus postzygotické reprodukční izolace popsany u řady eukaryot. Prvním objeveným genem hybridní sterility u obratlovců je myší gen *Hybrid sterility 1 (Hst1)*, později identifikovaný jako gen *Prdm9*. Genetickou a molekulární analýzou byl později na chromozomu X určen lokus, jehož interakce s *Prdm9* vede ke sterilitě anebo snížené fertilitě hybridních samců. Tento lokus obsahuje dva genetické faktory HS – *Hstx1* způsobující abnormální morfologii spermií a *Hstx2* způsobující zástavu spermatogeneze v pachytenních spermatocytech a sterilitu. Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na studium vlivu delecí kandidátního myšího X-vázaného genu hybridní sterility - *Fmr1nb*. Analýza samců B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> s delečními variantami genu *Fmr1nb* ukázala, že *Fmr1nb* je jedním z faktorů ovlivňujících spermiogenezi. U samců, nesoucích delece genu *Fmr1nb*, došlo k nárůstu morfologických abnormalit spermií, fenotyp identický s *Hstx1*. Vliv delecí genu *Fmr1nb* na průběh meiotické profáze I u hybridních samců (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F<sub>1</sub> nebyl prokázán. Teprve inaktivace *Fmr1nb*<sup>PWD</sup> testovaná v křížení (B6.ChrX.1s.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F<sub>1</sub> může vyloučit nebo potvrdit identitu s *Hstx2*.

## Klíčová slova:

Hybridní sterilita, *Mus musculus*, chromozom X, kandidátní geny, *Hstx1*, *Hstx2*, abnormální morfologie spermií, *Fmr1nb*.

## Abstract

Speciation, the formation of new species, is an essential evolutionary process that causes species diversity on the Earth. At the beginning of this process is the separation of two populations by a reproductive barrier that prevents gene flow between these populations. One of the mechanisms, which enable reproductive isolation, is hybrid sterility (HS). It is a mechanism of postzygotic isolation that is described in a number of eukaryotes. The first discovered gene of hybrid sterility in vertebrates is the mice gene *Hst1*, later identified as gene *Prdm9*. By genetic and molecular analysis the locus on the X chromosome was determined, whose interaction with *Prdm9* causes sterility or reduced fitness in male hybrids. This locus contains two genetic factors: *Hstx1*, causing an abnormal morphology of spermatozoa, and *Hstx2*, causing an arrest in spermatogenesis in pachytene spermatocytes and sterility. In my thesis I focus on the effect of deletion of a candidate hybrid sterility gene *Fmr1nb* on the X chromosome. The analysis of males B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> with deletion variants of the *Fmr1nb* gene showed that *Fmr1nb* is one of the factors influencing spermatogenesis. An increase in morphologic abnormalities in spermatozoa occurred in males with *Fmr1nb* gene deletion. This phenotype is identical with *Hstx1*. The effect of *Fmr1nb* gene deletion on the meiotic process in hybrid males (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 was not demonstrated. Only the inactivation of *Fmr1nb*<sup>PWD</sup> that is tested in crossbreeding (B6.ChrX.1s.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 can exclude or confirm the identity of *Hstx2*.

## Keywords:

Hybrid sterility, *Mus musculus*, the X chromosome, candidate genes, *Hstx1*, *Hstx2*, abnormal morphology of spermatozoa, *Fmr1nb*.

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Literární přehled .....	2
2.1	Reprodukčně izolační mechanismy .....	2
2.2	Hybridní sterilita .....	2
2.2.1	Modelový systém pro studium hybridní sterility .....	5
2.2.2	Molekulární základ hybridní sterility u <i>Mus musculus</i> .....	6
2.2.3	Gen <i>Prdm9</i> a jeho molekulární funkce .....	7
2.2.4	<i>Hst1/Prdm9</i> a jeho role v hybridní sterilitě.....	12
2.2.5	Role chromozomu X v hybridní sterilitě.....	13
3	Cíle práce.....	25
4	Materiály a metody .....	26
4.1	Chemikálie .....	26
4.1.1	Pufry a roztoky .....	26
4.1.2	Enzymy .....	27
4.1.3	Chemikálie pro PCR (polymerázovou řetězovou reakci), real-time RT-PCR, reverzní transkripci a sekvenování .....	28
4.1.4	PCR primery .....	28
4.1.5	Programy a databáze (Výrobce, nebo webová stránka).....	29
4.2	Metody .....	31
4.2.1	Chov myší .....	31
4.2.2	Pitva .....	31
4.2.3	Fenotypizace .....	32
4.2.4	Detekce apoptotických buněk pomocí kitu DeadEnd™ Fluorometric Tunel systém.....	42
4.2.5	Použité výpočetní a statistické metody pro interpretaci fenotypu: .....	43
4.2.6	Odběr tkáně pro izolaci DNA .....	44

4.2.7	Extrakce vysokomolekulární DNA pomocí Gentra® Puregene® Core Kit A od firmy Qiagen .....	44
4.2.8	Genotypizace.....	45
4.2.9	Elektroforéza.....	46
4.2.10	Purifikace DNA z gelu pomocí QIAEX II® Gel Extraction Kit .....	46
4.2.11	Sekvenace za použití BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit .....	47
4.2.12	Izolace celkové RNA pomocí High Pure RNA Tissue Kit.....	48
4.2.13	Izolace celkové RNA pomocí Trizol Reagents.....	49
4.2.14	Reverzní transkripce spojená s PCR (RT-PCR) .....	50
4.2.15	Kvantitativní RT-PCR analýza v reálném čase (real-time RT-PCR) .....	50
5	Výsledky.....	52
5.1	Výběr kandidátního genu .....	52
5.1.1	Predikce subcelulární lokalizace proteinu FMR1NB.....	53
5.1.2	Genotypování a sekvenace zástupců jednotlivých delečních linií .....	54
5.1.3	Testikulární exprese genu <i>Fmr1nb</i> u samců B6. <i>Fmr1nb<sup>mut</sup></i> .....	58
5.1.4	Charakterizace fenotypu u delečních linií genu <i>Fmr1nb</i> a kontrol (B6N) .....	60
5.1.5	Parametry fertility u parciálních konzomických kmenů a kontrol B6J a PWD .....	82
5.2	Ověření role genu <i>Fmr1nb</i> ve funkci pachytemního kontrolního bodu. Hybridi .....	84
5.2.1	Parametry fertility u hybridních potomků (B6N. <i>Fmr1nb<sup>mut</sup></i> x PWD)F1 a kontrol (B6N. <i>Fmr1nb<sup>wt</sup></i> x PWD)F1 .....	84
5.2.2	Imunocytochemie u hybridů.....	86
5.2.3	Histologie testis mutantních hybridů s delecí v genu <i>Fmr1nb</i> a jejich nemutantních sourozenců.....	88
6	Diskuze.....	92
6.1	Vliv delece genu <i>Fmr1nb</i> u B6. <i>Fmr1nb<sup>mut</sup></i> na spermatogenezi a spermiogenezi .....	92



6.1.1	Charakterizace fenotypu u delečních linií genu <i>Fmr1nb</i> a kontrol.....	95
6.2	Vliv delece genu <i>Fmr1nb</i> u (B6. <i>Fmr1nb</i> <sup>mut</sup> x PWD)F1 na spermatogenezi a spermiogenezi.....	100
7	Závěr.....	104
8	Přehled literatury: .....	105
9	Přílohy .....	111

## Seznam zkratek

Zkratka	Anglický překlad	Český překlad
<i>4930447F04Rik</i>	RIKEN cDNA 4930447F04 gene	Gen RIKEN cDNA 4930447F04
<i>4933436I91 Rik</i>	RIKEN cDNA 4933436I91 gene	Gen RIKEN cDNA 4933436I91
<i>a</i>	Recessive allele „a“	Recesivní alela „a“
<i>A</i>	Dominant allele „A“	Dominantní alela „A“
<i>Aff2</i>	AF4/FMR2 family member gene	Gen z rodiny AF4/FMR2
AMK	Amico acid	Aminokyselina
ApB	Apoptotic cell	Apoptotická buňka
ATR kináza	Ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase	Kináza ataxie telangiectasia příbuzná Rad3
<i>b</i>	Recessive allele „b“	Recesivní alela „b“
<i>B</i>	Dominant allele „B“	Dominantní alela „B“
B10	Inbred strain of laboratory - C57BL/10J	Laboratorní inbrední kmen - C57BL/10J
B6J	Inbred strain of laboratory - C57BL/6J	Laboratorní inbrední kmen - C57BL/6J
B6N	Inbred strain C57BL/6N	Inbred strain C57BL/6N
BAC	Bacterial artificial chromosomes	Bakteriální arteficiální chromozom
bp	Base pair	Pár bází
BRCA1	Breast cancer 1 gene	Gen rakoviny prsu 1
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Zinc finger domain (type: 2 Cysteine a 2 histidine)	Repetice zinkových prstů (typ: 2 cysteiny a 2 histidiny)
C3H	Inbred strain of laboratory - C3H/J	Laboratorní inbrední kmen - C3H/J
cDNA	Complementary DNA	DNA komplementární k RNA
CEN	Centromeric proteins	Centromerické proteiny
CGG	Trinucleotid repetit of cytosine, guanosine and guanosine	Trinukleotidová repetice cytosin, guanosin a guanosin
CO	Crossover	Crossing-over
CPA	Crosspoint <i>β-Actin</i>	Bod protnutí křivky pro <i>β-Aktin</i>
CPF	Crosspoint <i>Fmr1nb</i>	Bod protnutí křivky pro <i>Fmr1nb</i>
<i>Ctag2</i>	Cancer/testis antigen 2 gene	Gen rakovinnového/testikulárního antigenu 2
Dapi	(4',6-diamidin-2-fenylindol) - is a fluorescent stain that binds strongly to AT rich regions in DNA	(4',6-diamidino-2-phenylindole) - je fluorescenční barvivo navazující se silně k AT bohaté oblasti v DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonate water	Diethylpyrokarbonátová voda
dH <sub>2</sub> O	Distilled water	Destilovaná voda
D-M model	The Dobzhansky - Muller model of genetic incompatibility	Dobzhanský – Mullerův model genové inkompatibility
DMC1	DNA meiotic recombinase 1	Meiotická rekombináza DNA 1
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DNA DSB	DNA double strand break	Dvouvláknový zlom na DNA

DNáza	Deoxyribonucleases	Deoxyribonukleáza
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate	Deoxyribonukleotid trifosfát
<i>Dsbc1</i>	Double strand break control 1 gene	Gen kontrolující dvouvláknové zlomy 1
E	Glutamic acid	Kyselina glutamová
eS	Elongated spermatid	Elongovaná spermatida
eSb	Elongated spermatid with tail	Elongované spermatidy s bičíkem
F1	Filial generation one	První filiální generace
<i>Fmr1</i>	Fragile X mental retardation 1 homolog gene	Gen fragilní X-vazané mentální retardace
<i>Fmr1nb</i>	Fragile X mental retardation 1 neighbor gene	Gen sousedící s genem fragilní X-vazané mentální retardací
<i>Fmr2</i>	Fragile X mental retardation 2 homolog	Homolog 2 genu X-vázané fragilní mentální retardace
H1t	Testicular H1 histone	Testikulární histone H1
H2AX	H2AX histone variants	Histonová varianta H2AX
H3K4	Histone 3 and lysine 4	Histon 3 a lysin v pozici 4
H3K4me3	Histone H3 trimethyl lysine 4	Trimetylovaný histon H3 na lysinu 4
HORMAD2	Protein containing HORMA domain 2	Protein obsahující doménu HORMA 2
HS	Hybrid sterility	Hybrid sterilita
<i>Hst1</i>	Hybrid sterility 1 gene	Gen hybridní sterility 1
<i>Hstx1</i>	Hybrid sterility X chromosome 1 gene	Gen hybridní sterility X chromosomu 1
<i>Hstx2</i>	Hybrid sterility X chromosome 2 gene	Gen hybridní sterility X chromosomu 2
<i>JYAlpha</i>	<i>Jyalpha</i> – a gene causing male sterility in <i>Drosophila</i> hybrids	<i>Jyalpha</i> – gen způsobující samčí sterilitu u některých hybridů octomilky
Konc.	Concentration	Koncentrace
KRAB	Krüppel-associated box	Krüppel asociovaný box
kS	Round spermatid	Kulatá spermatida
L	Leucine	Leucin
Le	Leydig cells	Leydigova buňka
LEWES	Inbred strain derived from mice trapped in wild, LEWES, U.S.A.	Inbrední kmen odvozený od myši odchycených v přírodě, LEWES v USA
LRR doména	Leucin-rich repeat domain	Doména bohatá na leucinovou repetici
Me	Metaphase	Metafáze
Médium RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium	Médium
miRNA	MicroRNA	MikroRNA
MIT	Massachusetts Institute of Technology	Institute technologie v Massachusetts
mRNA	Messenger RNA	Informační RNA
MSCI	Meiotic sex chromosomes inactivation	Meiotická inaktivace pohlavních chromozomů
MSUC	Meiotic silencing of unsynapsed chromatin	Meiotické umlčení asynapsovaného chromatinu
mut	Mutation	Mutace

N	Number of individuals	Počet jedinců
NCBI	National Center for Biotechnology Information in USA	Národní centrum pro biotechnologické informace v USA
NCO	Non-crossover	Žádný crossing-over
nt	Nucleotid	Nukleotid
<i>OdsH</i>	Odysseus-homeobox gene causing HS in <i>Drosophila</i>	Gen – Odysseus způsobující HS u octomilky
<i>Ovd</i>	<i>Ovd (Overdrive)</i> gene causing HS in <i>Drosophila</i>	Gen <i>ovd</i> způsobující HS u octomilky
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PFA	Paraformaldehyde	Paraformaldehyd
PR/SET	Positive Regulatory/Su(var) 3-9, Enhancer-of-zeste, Trithor	Pozitivní regulační element (Su(var) 3-9, zesilovač, Trithorax
<i>Prdm9</i>	PR domain containing 9 gene	Gen obsahující PR doménu 9
Primár.	Primary antibodies	Primární protilátka
PsV	„Pseudovacuole“ – hole after the apoptosis	„pseudovakuola“ – díra po proběhlé apoptóze
PWD	Inbred strain of laboratory – PWD/Ph	Laboratorní inbrední kmen – PWD/Ph
PWK	Inbred strain of laboratory – PWK/Ph	Laboratorní inbrední kmen – PWK/Ph
QTL	Quantitative trait locus	Lokus pro kvantitativní znak
<i>Rcr1</i>	Recombination regulator 1 gene	Gen regulující rekombinaci 1
Reverzní transkriptáza	Murine Moloney Leukemia Virus reverse transcriptase	Reverzní transkriptáza leukemického viru hlodavců
M-MLV	RNA-induced silencing complex	Komplex indukující umlčení RNA
RISC	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RNA	Ribonucleases	Ribonukleáza
RNáza	Spermatocyte	Spermatocyt
Sc	Secondary antibodies	Sekundární protilátka
Sekund.	Sertoli cell	Sertoliho buňka
Ser	Spermatogonia	Spermatogonie
Sg	Seminiferous tubule	Semenotvorný kanálek
Sk	SLIT and NTRK-like family, member 2 gene	Gen, jenž je příbuzný rodině SLIT a NTRK
<i>Slitrk2</i>	Single nukleotid polymorphism	Jednonukleotidový polymorfismus
SNP	Spermatocyte	Spermatocyt
Sp	Homolog of yeast sporulation protein 11	Homologní protein ke kvasinkovému proteinu 11 uplatňujícímu se ve sporulaci
SPO11	Simple sequence lenght polymorphism	Jednoduchý sekvenční délkový polymorfismus
SSLP	Synovial sarcoma X	Synoviální sarkom X
SSX	Synaptonemal complex protein 1	Protein synaptonemálního komplexu 1
SYCP1	Synaptonemal complex protein 3	Protein synaptonemálního komplexu 3
SYCP3	Transcription activator-like effector nucleases	Nukleáza podobná transkripčnímu aktivatoru
TALEN		

Taq polymeráza	DNA polymerase of <i>Thermus aquaticus</i>	DNA Polymeráza izolována z <i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase	Terminální deoxynukleotidyl transferáza
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling	Značení zlomů přidáním dUTP pomocí terminální deoxynucleotidyl transferázy
ÚMG	The institute of molecular genetics	Ústav molekulární genetiky
UTR	Untranslated region	Nepřekládaná oblast
WSB	Watkins Star Line B, inbred strain derived from mice trapped in wild, Maryland, U.S.A.	Inbrední kmen odvozený od myši , odchycených v přírodě, Maryland, USA
wt	Wild type	Divoký typ
<i>Xist</i>	X inactivation specific transcript	Transkript specifický pro inaktivaci X
X <sup>PWD</sup>	X chromosome of origin PWD	Chromozom X původu PWD
YAC	Yeast artificial Chromosome	Kvasinkový arteficiální chromozom
γ-H2AX	Phosphorylation in serine 139 of histone H2AX	Fosforylace serinu v pozici 139 na histone H2AX

# 1 Úvod

Hybridní sterilita (HS) představuje jednu z forem postzygotické reprodukční bariery zabráňující genovému toku mezi rozdílnými druhy, čímž umožňuje speciaci (vznik nových druhů). Důsledkem HS je reprodukční izolace mezi blízkými druhy

V naší laboratoři se tímto tématem zabýváme od roku 1974 a v roce 2009 se nám povedlo jako první laboratoři na světě identifikovat první genetický lokus kontrolující tuto formu postzygotické izolace u obratlovců – gen Hybrid sterility 1 (*Hst1*) u myši domácí, který byl později identifikován jako gen *Prdm9* (z angl. PR domain containing 9 gene) (MIHOLA *et al.* 2009). Využití myších poddruhů *Mus m. musculus* a *Mus m. domesticus* nám přináší jedinečnou možnost studovat příčinu hybridní sterility, neboť oba dva myší poddruhy se od společného předka oddělily teprve nedávno a nevznikla mezi nimi tedy ještě úplná reprodukční izolace.

Dalšími genetickými a molekulárními analýzami se potvrdila důležitá role chromozomu X při speciaci a byly zde určeny další dva lokusy v úseku dlouhém 4,7 Mb kontrolující hybridní sterilitu. Jedním z nich je gen Hybrid sterility X chromosome 1 (*Hstx1*), jenž je asociován s abnormalitami v morfologii spermií (STORCHOVA *et al.* 2004). Druhým lokusem je gen Hybrid sterility X chromosome 2 (*Hstx2*), jenž u mezidruhových hybridů způsobuje zástavu spermatogeneze v profázi meiózy I.

Ve své diplomové práci jsem se pomocí molekulárních technik zaměřila na vliv delece X-vázaného kandidátního genu hybridní sterility - genu *Fmr1nb* (z angl. Fragile X mental retardation 1 neighbor gene) na spermatogenezi a spermiogenezi. Na základě analýzy B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> s delečními variantami genu *Fmr1nb*, se skutečně potvrdilo, že tento gen je jedním z faktorů ovlivňující spermiogenezi a mohl tak být jedním z genu zapříčiňujícím fenotyp genetického faktoru *Hstx1*. U hybridních samců (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 se však neprokázal vliv delece na průběh profáze meiózy I. Jednoznačné vyloučení nebo potvrzení identity *Fmr1nb* s *Hstx2* bude možné až po analýze samců (B6.ChrX.1s.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1.

Hybridní sterilita je obecný mechanismus známý u různých eukaryot a předpokládá se, že by mohl být příčinou oddělení neandrtálce od moderního člověka. Tudíž jejím studiem můžeme vyplnit mezeru ve znalosti evolučního vývoje člověka. Navíc myš představuje unikátní modelový organizmus pro obratlovce. Některé meiotické regulace fungující u myši by mohly být extrapolovány i na člověka a pomoci tak řešit vzrůstající problém mužské neplodnosti.

## **2 Literární přehled**

### **2.1 Reprodukčně izolační mechanismy**

Jedním z rysů života na planetě Zemi je velká druhová rozmanitost, která je způsobena biologickým procesem vzniku druhů - speciací. Mayerova koncepce biologického druhu definuje druh jako populaci, jejíž členové se pohlavně rozmnožují a jež je od jiné populace/druhu reprodukčně izolována. Specie je tedy zajištěna vznikem reprodukčně izolačních mechanismů (MAYER 1963). Mechanismy, které způsobují tuto reprodukční izolaci a zabraňují genovému toku mezi populacemi, dělíme na prezygotické, snižující pravděpodobnost vzniku hybridních zygot a postzygotické, snižující pravděpodobnost vývoje hybridních zygot v dospělého nebo fertilního jedince (shrnutí v COYNE a ORR 1998; COYNE a ORR 2004). Mezi prezygotické izolační faktory patří prostorová, časová, ekologická, etologická, behaviorální izolace nebo například gametická inkompatibilita. Mezi postzygotické izolační faktory řadíme hybridní sterilitu a neživotoschopnost hybridů (shrnutí v COYNE a ORR 1998; COYNE a ORR 2004).

### **2.2 Hybridní sterilita**

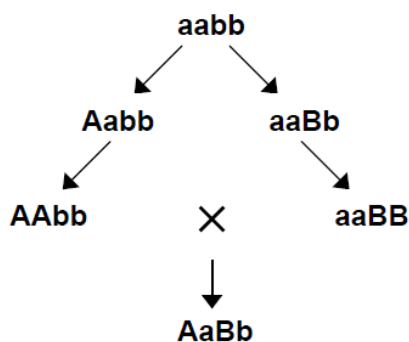
Hybridní sterilita je definována jako situace, ve které dvě fertilní parentální formy produkují hybridní potomstvo, které je sterilní (DOBZHANSKY 1937). Sterilita hybridů heterogametického pohlaví mezi blízkými druhy, poddruhy nebo sesterskými populacemi je zřejmě v raném období speciace počáteční reprodukční bariérou, později následuje neživotoschopnost hybridů, mezidruhovná neslučitelnost gamet a nakonec izolace prezygotická (shrnutí v COYNE a ORR 1998).

Jako příčina sterility hybridů nebo jejich neživotoschopnosti jsou uváděny tři typy genetických poruch: odlišná ploidita rodičů (polyploidní speciace), chromozomální přestavby (chromozomová speciace), anebo genová inkompatibilita způsobena odlišností rodičovských alel, které u hybridů nefungují správně (shrnutí v COYNE a ORR 2004; RIESENBERG 2001; RIESENBERG A WILLIS 2007).

Ačkoliv molekulární detaily mechanismů hybridní sterility nejsou objasněny, všeobecně přijímané genetické principy hybridní sterility a speciace byly postulovány již v první polovině dvacátého století Haldanem, Dobzhanským, Mullerem, a později Coyne (HALDANE 1922; MULLER 1940; DOBZHANSKY 1937; COYNE a ORR 1989).

Dobzhanský a později Muller navrhli model genové inkompatibility (Dobzhanský - Mullerův model) pro vysvětlení genetické příčiny hybridní sterility

(MULLER 1940; DOBZHANSKY 1937). Jakmile dojde v důsledku alopatrické (geografické) izolace k rozdělení původní populace na dvě dceřiné populace, postupně v nich dochází k hromadění odlišných mutací a fixaci rozdílných alel. Tyto nové alely jsou sice kompatibilní s genetickým pozadím populace, ve které vznikly, ale některé z nich nejsou kompatibilní s genetickým pozadím druhé dceřiné populace. Pokud se tyto oddělené, geneticky odlišné populace znovu zkříží, vzniklý hybrid je sterilní anebo neživotaschopný v důsledku negativní epistatické interakce mezi těmito novými alelami (MULLER 1940; DOBZHANSKY 1937) (viz obrázek 1.). Sterilita hybridů je tedy vedlejším produktem časově dostatečně dlouhého oddělení genomů u dvou geograficky izolovaných populací. Model předpokládá, že genové inkompatibility mají jednotlivě jen slabý efekt na hybridní sterilitu nebo neživotaschopnost. Úplná postzygotická izolace pak vyplývá z kombinace vlivů více genových inkompatibilit (shrnutí v COYNE a ORR 2004).



Obrázek 1.: Dobzhanský – Mullerův model genové inkompatibility (D-M model). D-M model popisuje situaci, kdy v důsledku reprodukčně izolačních mechanismů dojde rozdělení jedné populace (aabb) na dvě dceřiné. Například v jedné z těchto dceřiných populací vznikne mutací alely „a“ alela „A“ (Aabb) a v druhé dceřiné populaci mutace alely „b“ vytvoří alelu „B“ (aaBb). Obě nové mutace se v dceřiných populacích mohou zafixovat a fungovat v nich normálně, protože obě nové vzniklé alely „A“ a „B“ jsou zcela kompatibilní s genetickým pozadím v jednotlivých oddělených dceřiných populacích. Naproti tomu už nemusí být kompatibilní se smíšeným genetickým pozadím u jejich hybridního potomka. Výsledkem této nežádoucí interakce mezi novými alelami je jedinec, který je sterilní nebo neživotaschopný (AaBb). Vytvořeno podle COYNE a ORR (2004).

U mezidruhových kříženců, pozoroval J. B. Haldane jako první sníženou fertilitu nebo neživotaschopnost pouze u jednoho pohlaví, jímž je zpravidla pohlaví heterogametické. Definice tohoto jevu je známa jako Haldaneovo pravidlo: „Pokud v F1 generaci, která vznikla křížením dvou druhů, chybí jedno pohlaví, je vzácné nebo sterilní, je to pohlaví heterogametické“ (HALDANE 1922). Dle Haldaneova pravidla jsou u *Mus musculus* sterilitou mezidruhových kříženců postiženi samci (shrnutí v PRESGRAVES 2002).

Pro vysvětlení Haldaneova pravidla bylo navrženo několik teorií. Jednou z nejvíce přijímaných je teorie dominance navržená Dobzhanským a Mullerem, která podává vysvětlení



hybridní sterility a speciace. V roce 1940 Muller navrhl model genové inkompatibility vycházející z toho, že jedinec heterogametického pohlaví má všechny autozomy párové avšak pouze jednu kopii chromozomu X. Pokud by u hybridů jeden lokus odpovědný za inkompatibilitu ležel na chromozomu X a druhý na autozomu a pokud by interakce mezi nimi byla recesivní povahy, tak se snížená zdatnost projeví jen u heterogametického pohlaví nesoucího jeden chromozom X (MULLER 1940).

Coyne předpokládal, že pokud by za sterilitu a sníženou životaschopnost hybridních samců byly odpovědné recesivní X-vázané geny, tak by i hybridní samice, homozygotní pro chromozom X (dva chromozomy X ze stejného druhu), byly sterilní a neživotaschopné stejně jako hybridní samci. I u nich by se totiž mohla projevit inkompatibilita mezi X-vázaným lokusem a autozomem. Za účelem ověření této hypotézy byly připraveny hybridní samice drozofily (*D. simulans* - *D. mauritiana*), které ale nesly dva chromozomy X ze stejného druhu. Tyto samice navzdory očekávání zůstaly fertilní (COYNE 1985). Ke stejnému závěru došli Dzur-Gejdosová a kolegové (2012) s využitím konzomických kmenů myší poddruhů *Mus m. musculus* a *Mus m. domesticus*. Nicméně Mullerova teorie je ale dále schopna vysvětlit Haldaneovo pravidlo pro snížení životaschopnosti, neboť samice drozofily s nevyváženým genomem, tedy homozygotní pro X jinak na hybridním pozadí, vykazovaly stejné snížení životaschopnosti jako hybridní samci (COYNE 1985). Za předpokladu, že by za letalitu hybridních samců a samic s nevyváženým genomem odpovídaly stejné geny, ale za sterilitu nikoliv, tak by nemusel být u samic na chromozomu X shodou okolností žádný lokus zodpovědný za sterilitu hybridních potomků (ORR 1993). Platnost dominantní teorie bylo nutno ověřit dalšími experimenty a ty stály na předpokladu, že i na autozomech by měly existovat recesivní geny, jejichž interakce s X-vázaným lokusem způsobuje u samčích hybridů snížení fitness. Ačkoliv tyto geny se kvůli recesivní povaze u samic F1 hybridů neprojeví, tak pokud budou v homozygotním stavu, měly by ovlivnit i fitness samic. Tento předpoklad se skutečně potvrdil na experimentech s drozofilou (HOLLOCHER a WU 1996; TRUE *et al.* 1996; TAO *et al.* 2003).

Dalším ověřením platnosti Mullerovy teorie dominance by mohly být i experimenty porovnávající různé taxony drozofil (*Drosophila*) s různě velkými chromozomy X. Předpoklad byl, že u taxonů s velkým chromozomem X by se měla projevit hybridní sterilita dříve, než u taxonů s malým chromozomem X. Skutečně u taxonů drozofil, jejichž chromozom X nesl přibližně 40 % všech genů přítomných v genomu, se hybridní sterilita projevila dříve, než

u taxonů s malým chromozomem X, které nesly přibližně 20 % všech genů genomu (TURELLI a BEGUN 1997).

### 2.2.1 Modelový systém pro studium hybridní sterility

Ačkoliv je hybridní sterilita rozšířena u řady eukaryot, první geny hybridní sterility byly identifikovány teprve nedávno u drozofily a myši domácí (*Mus musculus*). Identifikované geny způsobující sterilitu u hybridních potomků drozofily jsou *OdsH*, *JYAlpha* a *Ovd* (TING *et al.* 1998; MASLY *et al.* 2006; PHADNIS a ORR 2009) a myši domácí - *Prdm9* (též pod názvem Meisetz – Meiosis induced factor containing PR/SET domain and zing-finger motif) (MIHOLA *et al.* 2009). Hybridní sterilita u *Mus musculus* může být studována jednak na divoké populaci myší odchycených podél hybridní zóny (například TURNER a HARR 2014; PIÁLEK *et al.* 2001; PIÁLEK *et al.* 2005), anebo na inbredních kmenech odvozených z evolučně oddělených druhů anebo poddruhů (například MIHOLA *et al.* 2009).

*Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* jsou poddruhy myši domácí, které se oddělily od společného předka před 0,3-0,5 milióny let (GERALDES *et al.* 2008; GERALDES *et al.* 2011). Doposud se mezi nimi nevyvinula úplná reprodukční izolace, což nám teoreticky umožňuje studovat původní příčiny hybridní sterility. U druhů evolučně oddělených delší dobu s plnou reprodukční bariérou mohou být původní příčiny skryty mezi sekundárními znaky, které jsou důsledkem již existující reprodukční izolace, a proto hybridi takových druhů jsou pro identifikaci genů HS méně vhodné. Teritorium poddruhu *Mus m. musculus* se nachází v severní Asii a východní Evropě. Poddruh *Mus m. domesticus* nalezneme na Blízkém východě, v severní Africe a západní Evropě, odkud se rozšířil do Ameriky, Afriky a na jiné oceánské ostrovy. V oblasti sekundárního kontaktu se mohou poddruhy s určitým omezením mezi sebou křížit a produkovat hybridní potomstvo. Oblast výskytu hybridů je pojmenována jako hybridní zóna. Hybridní zóna, tedy výskyt hybridů mezi poddruhy *Mus m. musculus* a *Mus m. domesticus*, prochází střední Evropou od Dánska přes západní výběžek Česka, přes balkánský poloostrov k Černému moři (viz obrázek 2.) (GERALDES *et al.* 2008; GERALDES *et al.* 2011; JANOUSEK *et al.* 2012; MACHOLÁN *et al.* 2007).



Obrázek 2.:Hybridní zóna mezi *Mus m. musculus* a *Mus m. domesticus* v Evropě. Převzato z MACHOLÁN *et al.* 2008.

### 2.2.2 Molekulární základ hybridní sterility u *Mus musculus*

Hybridní sterilita je polygenní znak, který je podmíněn epistatickou interakcí mezi více geny (ORR a IRVING 2001). Navíc se mohou geny způsobující hybridní sterilitu projevit jen u hybridního jedince na smíšeném genetickém pozadí, ale ne v rodičovské populaci (PEREZ a WU 1995). Jak složitost epistatických interakcí, tak i nutnost použití hybridů komplikuje výzkum HS v přírodě na hybridní zóně. Úspěšnou alternativou pro studium HS se stal laboratorní model založený na křížení geneticky definovaných laboratorních kmenů myši domácí odvozených od poddruhů *Mus m. musculus* (kmen PWD/Ph, dále jen PWD) a *Mus m. domesticus* (kmen C57BL/6J, dále B6J) (GREGOROVÁ a FOREJT 2000). Pomocí QTL analýzy u těchto kříženců byly určeny dva významné lokusy HS. Analýza QTL (z angl. Quantitative trait locus) představuje analýzu genetické asociace lokusu kvantitativního znaku s variantami molekulárních markerů a tedy určení jeho místa v genomu. U polygenních znaků, jako je hybridní sterilita, analýza QTL umožňuje identifikovat počet nezávislých míst v genomu, které za tento znak zodpovídají. Tato místa byla u kříženců odhadována sledováním korelace fenotypových znaků (váha *testes* (respektive varlat) a počet spermií) a genotypu. Kříženci jednotlivých fenotypů byli genotypováni pomocí SSLP (z angl. simple sequence

length polymorphism, pomocí tzv. MIT markerů – z angl. Massachusetts Institute of Technology). Hlavní výhodou SSLP je, že jsou vysoce polymorfní mezi kmeny. Jeden z HS QTL byl lokalizován na chromozom 17 a shoduje s *Hst1/Prdm9* (MIHOLA *et al.* 2009) a druhý lokus se nachází na chromozomu X shodující se s oblastí *Hstx1* a *Hstx2* (DZUR-GEJDOSOVÁ *et al.* 2012). Ačkoliv tato místa jsou nezbytná pro sterilní fenotyp, nejsou pro jeho úplnou manifestaci dostačující (DZUR-GEJDOSOVÁ *et al.* 2012, FLACHS *et al.* 2012).

### 2.2.3 Gen *Prdm9* a jeho molekulární funkce

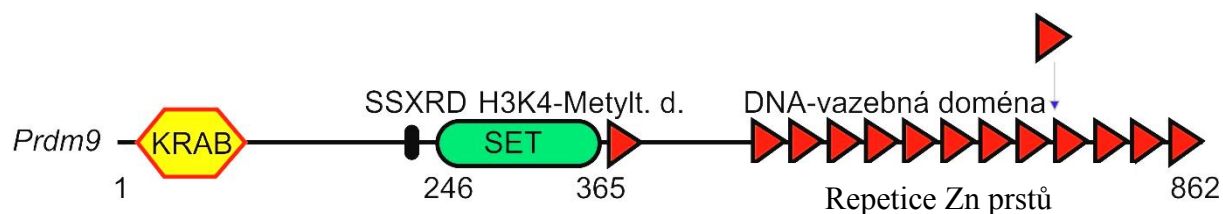
První genetický lokus hybridní sterility u obratlovců byl zmapován pomocí křížení divokých myší podkmene *Mus m. musculus* s laboratorními kmeny odvozených dominantně z podkmene *Mus m. domesticus* C57BL/10J (dále B10) a C3H/J (dále C3H). Rozdíl mezi myšími kmeny B10 a C3H s ohledem na hybridní sterilitu spočíval v jednom lokusu. Autoři jej nazvali Hybrid sterility 1 (FOREJT a IVANYI 1974). Později byl připraven z divokých myší poddruhu *Mus m. musculus* inbrední kmen PWD/Ph (GREGOROVÁ a FOREJT 2000). Hybridní potomci (B10 x PWD)F1 (první filiální generace), v důsledku interakce *Hst1<sup>s</sup>* alely, pocházející z B10 a *Hst1<sup>ws</sup>* pocházející z PWD, vykazovali sterilní fenotyp (nižší váhu *testes*, žádné spermie v *ductus epididymis* (nadvarleti) a ranou meiotickou zástavu). U hybridních potomků (*Mus m. musculus* x C3H)F1 ale interakce mezi alelou *Hst1<sup>f</sup>* (původu C3H) a *Hst1<sup>ws</sup>* takový sterilní fenotyp nezpůsobila (FOREJT a IVANYI 1974).

Postupně byl genetický lokus *Hst1* lokalizován za pomoci pozičního klonování, genetického a fyzikálního mapování do 250 kb dlouhého intervalu na chromozomu 17 (FOREJT *et al.* 1991; GREGOROVÁ *et al.* 1996; TRACHTULEC *et al.* 1997; TRACHTULEC *et al.* 2008). Poziční klonování je metoda pro identifikaci genu odpovědného za určitý genotyp na základě určení jeho pozice na genetické nebo fyzikální mapě, propojuje tedy konkrétní genetickou mapu nebo genomovou sekvenci s fenotypem. Při genetickém mapování se v případě lokalizace *Hst1* využilo zpětné křížení (zpětné křížení F1 křížence na původní rodičovský genotyp) mezi laboratorními inbredními kmeny C3H a B10, jež se lišily alelou *Hst1*. Rekombinantní potomci byli charakterizováni pomocí mikrosatelitních markerů (krátké tandemové (CA)<sub>n</sub> repetice) a dále byly u hybridních potomků vzniklých jejich křížením s *Mus m. musculus* (PWD) testovány parametry fertility. Na základě korelace konkrétního genotypu a mutantního fenotypu byla získána podrobná genetická mapa chromozomu 17 v kritické oblasti *Hst1* (GREGOROVÁ *et al.* 1996). Po obdržení genetické mapy se dala vytvořit fyzikální mapa oblasti, která zahrnuje genetický lokus *Hst1*, s využitím knihovny YAC (z angl. Yeast artificial chromosome). Z této knihovny byly postupně izolovány klony YAC kandidátní oblasti

a ty byly uspořádány do vzájemně se překrývajících kontigů. Vzdálenost mezi jednotlivými markery charakteristickými pro kandidátní oblast byla získána za pomoci restričního mapování klonů YAC pomocí pulzní elektroforézy. Zkombinováním dat, které byly obdrženy z genetického a fyzikálního mapování, byl izolován konkrétní klon YAC obsahující genetický lokus *Hst1* (TRACHTULEC *et al.* 1997). V této vyklonované oblasti byly identifikovány klony BAC (z angl. bacterial artificial chromosome) myší genomové DNA a následně hledány kandidátní geny hybridní sterility.

V roce 2009 byl genetický lokus *Hst1* identifikován v naší laboratoři jako gen *Prdm9*. *Hst1/Prdm9* byl prvním identifikovaným genem pro hybridní sterilitu u obratlovců. Experiment pro určení identity *Hst1* byl založen na obnově fertility u myší, jež nesly sterilní genotyp – *Hst1<sup>ws</sup>/Hst1<sup>s</sup>* za pomoci transgeneze pomocí konstruktů BAC, které nesly genomové fragmenty z kritické oblasti chromozomu 17. Tato oblast obsahovala sedm kandidátních protein kódujících genů. Pouze jeden klon BAC byl schopen komplementovat sterilní fenotyp. Analýzou transgenních myší, nesoucích odlišné BAC klony, se výběr zúžil na jeden jediný gen, jímž je *Prdm9* (MIHOLA *et al.* 2009).

Gen *Prdm9* se vyznačuje expresí v *testes* a *ovariích* (vaječnících) a kóduje tkáňově specifickou trimethyltransferázu histonu 3 na lyzinu 4 (H3K4). Skládá se z N-koncové domény KRAB (z angl. Krüppel-associated box), SSXR (z angl. synovial sarcoma X) represní domény, centrální domény, vnitřního zinkového prstu a na C-konci umístěné repetice zinkových prstů ( $C_2H_2$  – typ: 2 cysteiny a 2 histidiny) (angl. zinc finger domain), které určují specifitu vazby k DNA (viz obrázek 3.).



Obrázek 3.: **Schéma struktury proteinu kódovaného genem *Prdm9*:** PRDM9 se skládá z KRAB domény (oranžový šestiúhelník), SSXR (černá čárka), PR/SET (zelený ovál) domény jednoho DNA vazebného motivu zinkového prstu ve středu a C terminální repetice zinkových prstů (červený trojúhelník). Myší kmeny se liší počtem zinkových prstů. Vytvořeno podle Oliver *et al.* (2009).

Trimethylace histonu 3 na lyzinu 4 je katalyzována PR/SET doménou. KRAB doména zodpovídá za vazbu potenciálních interakčních proteinů. Myši s genotypem *Prdm9<sup>-/-</sup>* vykazují zástavu spermatogeneze a oogeneze v pachytemním stádiu, narušení opravy dvouřetězcových zlomů DNA (DSB z angl. double strand break) a párování homologních chromozomů, distorzi

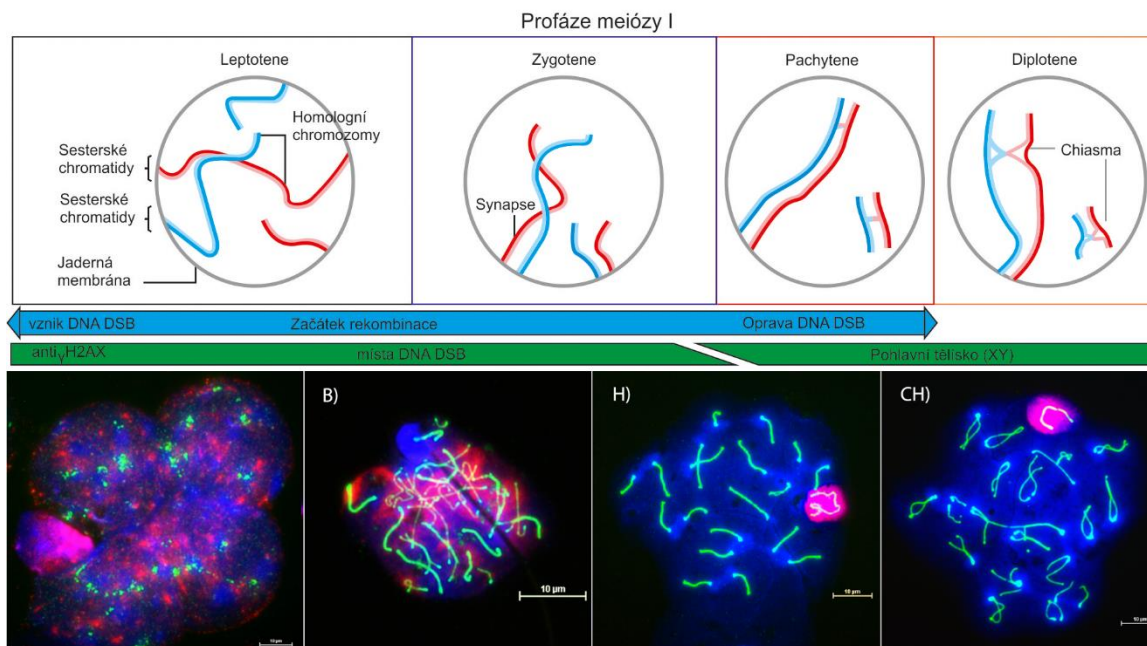
pohlavního tělíska (XY tělísko) a jsou sterilní (BAUDAT *et al.* 2010; HAYASHI *et al.* 2005; PARVANOV *et al.* 2010; BIRTLE a PONTING 2006).

Autoři původní práce (MIHOLA *et al.* 2009) porovnali fenotyp samců (PWD x B6)F1 a delečních mutantů *Prdm9*<sup>-/-</sup> a pozorovali u nich podobný fenotyp, tedy menší *testes*, žádné spermie v semenotvorných kanálcích, zástavu spermatogeneze v průběhu meiózy I v pachytene, selhání ve formování XY tělíska a neschopnost párování homologních chromozomů. Rozdíl byl však pozorován ve sterilitě spojené s pohlavím myši. Myši s genotypem *Prdm9*<sup>-/-</sup> vykazovaly sterilitu bez závislosti na pohlaví, oproti tomu sterilita u F1 hybridů byla pozorována výlučně u samců. To znamená ve shodě s Haldaneovým pravidlem. Autoři tento rozdíl vysvětlují skutečností, že sterilní fenotyp u hybridů je způsoben, dle D-M modelu, nežádoucí epistatickou interakcí genu *Prdm9* s dosud neznámým lokusem na chromozomu X. Oproti tomu deleční mutanti genu *Prdm9* jsou nositelé úplného umlčení genu v obou kopiích. Druhým podstatným rozdílem je, že delece genu *Prdm9* je sama osobě schopna způsobit sterilní fenotyp (MIHOLA *et al.* 2009), oproti tomu u F1 hybridů sterilita je výsledkem interakce genetického lokusu *Hst1* s dalšími lokusy: na chromozomu X a s heterozygotním genetickým pozadím (DZUR-GEJDOSOVÁ *et al.* 2012)

Meióza je typem redukčního dělení, jež u pohlavně rozmnožujících se organismů umožňuje vznik gamet. V profázi meiózy I dochází k párování homologních chromozomů pocházejících od matky a od otce a jejich rekombinaci. Následnou segregací chromatid během meiotického dělení I a II vznikají gamety s haploidním počtem chromozomů.

V průběhu leptotenního období profáze meiózy I dochází nejdříve ke vzniku dvouřetězcových zlomů DNA pomocí meiotické DNA topoizomerázy typu II - SPO11 (z angl. homolog of yeast sporulation protein 11). V průběhu zygotene dochází postupně k párování homologních chromozomů, které je dovršeno v pachytene. Dvouvláknové zlomy DNA mohou být opraveny buď homologní rekombinací, která vyúsťuje v „crossover“ (CO), anebo genovou konverzí, jejímž výsledkem je „non crossover“ (NCO). Pomocí homologní rekombinace dochází k výměně genetické informace mezi homologními chromozomy a vznikají zcela nové kombinace alel, které neměly obdoby v rodičovských chromozomech (viz dále) (shrnutí v BAUDAT *et al.* 2013). Sekvenci události zahrnuje obrázek 4.





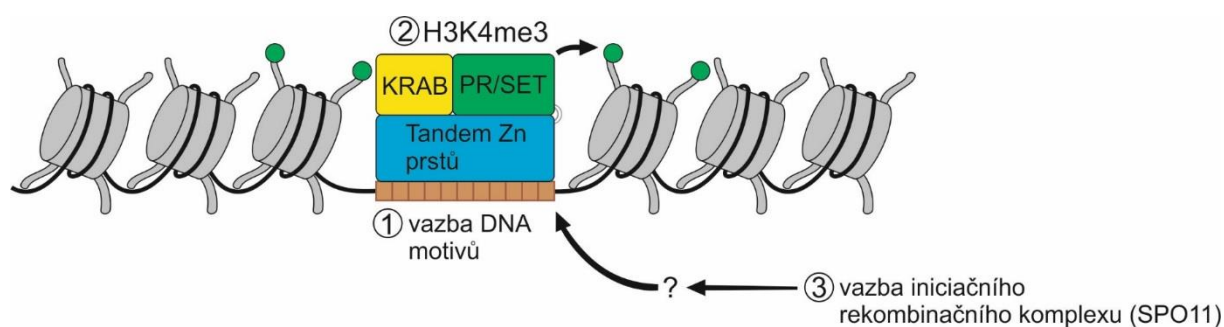
Obrázek 4.: **Schéma profáze meiózy I.** Chromozomy jsou na obrázku ilustrovány jako dva páry homologních chromozomů, každý z nich obsahující dvě sesterské chromatidy. V průběhu leptotene dochází ke vzniku dvouřetězcových zlomů DNA pomocí SPO11, které je kompletní před vstupem do pachytene. Od začátku zygotene se začínají homologní chromozomy postupně párovat a v pachytene je zcela utvořen synaptonemální komplex, který váže homologní chromozomy k sobě. Dvouvláknové zlomy DNA jsou postupně opraveny, menší část dá vzniku homologním rekombinacím (asi 10 %) a ostatní genové konverzi (asi 90 %). Během přechodu z pachytene do diplotene se rozpadá synaptonemální komplex a homologní chromozomy se od sebe postupně oddalují (disjunkce) a zůstávají propojeny v chiazmatech (v místech, kde proběhla rekombinace). Vytvořeno podle BAUDAT *et al.* (2013), doplněno vlastními imunocytologickými obrázky.

V roce 2009 bylo zjištěno, že epigenetická značka - trimetylace čtvrtého lysinu na histonu H3 značí iniciaci rekombinační události a je, nezávisle na SPO11, značně obohacena na místech „rekombinačních hotspotů“. Úroveň metylace se v průběhu profáze mění, ale maximum vykazuje v přechodném období mezi leptotene a zygotene. Autoři navrhli hypotézu, že právě gen *Prdm9* by mohl kontrolovat distribuci H3K4me3 v „rekombinačních hotspotech“ (trimetylaci histonu H3 v pozici na lyzinu 4) (BUARD *et al.* 2009). Skutečně gen *Prdm9* leží uvnitř nedávno objevené kritické genomové oblasti, jež kontroluje aktivitu v hotspotech pomocí distribuce H3K4me3. Tento lokus na chromozomu 17 byl nazván *Dsbc1* (z angl. Double strand break control 1), popř. *Rcr1* (z angl. Recombination regulator 1) (GREY *et al.* 2009; PARVANOV *et al.* 2009). Dvě nezávislé studie za pomoci myších kříženců laboratorních myších kmenů odvozených z divokých myších kmenů mezi *Mus m. molossinus*, resp. *Mus m. castaneus* a *Mus m. domesticus*, kteří se kromě odlišné alely *Dsbc1/Rcr1*, lišili i mírou trimetylace H3K4me3 ve dvou rekombinačních hotspotech (*Psm9* a *Hlx1*), potvrdily,

že gen *Prdm9* kontroluje umístění rekombinačních hotspotů (BAUDAT *et al.* 2010; PAVANOV *et al.* 2010).

O lokalizaci „rekombinačních hotspotů“ rozhoduje vazba PRDM9 k DNA pomocí C terminální domény obsahující repetici zinkových prstů (GREY *et al.* 2011). Myší kmeny s rozdílnou formou alely genu *Prdm9* vykazovaly rozdílné kombinace a počet repetice zinkových prstů a umístění rekombinačních hotspotů. Právě tento polymorfismus v sekvenci a počtu repetice je klíčový pro specifitu vazby proteinu PRDM9 k DNA (GREY *et al.* 2011; BAUDAT *et al.* 2010).

PRDM9 se váže k DNA sekvenčně specificky pomocí repetice zinkových prstů (BILLINGS *et al.* 2013) a katalyzuje trimetylaci H3K4 na nukleozomech obklopujících vazebné místo. Tato lokální posttranslační modifikace chromatinu indukuje reorganizaci nukleozomů – tedy remodelaci chromatinu, jež vede k vytvoření centra očištěného od nukleozomů (BAKER *et al.* 2014). Rekombinační iniciační komplex obsahující SPO11 se za pomoci PRDM9, nebo popřípadě jeho interakčního partnera, váže v blízkosti oblasti bez nukleozomů a iniciuje vznik dvouvláknových zlomů DNA, které indukují fosforylaci histonu H2AX v okolních nukleozomech (H2AX je varianta histonu H2A, který je součástí histonového oktameru) (viz dále). Dvouvláknové zlomy DNA mohou být následně opraveny homologní rekombinací vedoucí ke CO anebo genovou konverzí vedoucí k NCO (viz obrázek 5.) (BAKER *et al.* 2014; GREY *et al.* 2011).



**Obrázek 5.: Model role PRDM9 v lokalizaci dvouvláknových zlomů DNA v průběhu meiózy I.** PRDM9 se váže na specifický DNA motiv (hnědý obdélník) za pomoci repetice zinkových prstů (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, modrý obdélník). Následně PR/SET doména katalyzuje H3K4me3 (zelená kulička) na přilehlém nukleozómu. KRAB doména by mohla interagovat s dalšími proteiny. PRDM9 sám, nebo jeho interakční partner, popřípadě modifikace chromatinu by mohli vázat iniciační rekombinační komplex obsahující SPO11. Vytvořeno podle BAUDAT *et al.* (2013).

Pouze některá potenciální PRDM9 vazebná místa jsou využita pro formování rekombinačních hotspotů. Pravděpodobně schopnost PRDM9 rozpoznat své vazebné místo



bude záviset i na konformaci chromatinu (BAKER *et al.* 2014). Analýzou delečních mutantů genu *Prdm9* bylo odhaleno, že i v nepřítomnosti PRDM9 dochází k trimetylaci H3K4. H3K4me3 v alternativních „rekombinačních hotspotech“, které byly ale z 99 % v odlišných místech oproti hotspotům u kontrolních myši. Tato alternativní místa se nacházejí v promotorech anotovaných genů ve 44 % případů. Ve srovnání pouze 3 % hotspotů se nacházela v těchto místech u normálních spermatocytů kontrolních jedinců. Sterilita *Prdm9*<sup>-/-</sup> myši naznačuje, že samotná rekombinace v těchto funkčních oblastech (promotorech atd.) je pravděpodobně nekompatibilní s gametogenezí. To znamená, že PRDM9 je zcela nezbytný pro určení lokalizace hotspotů (98 % hotspotů je označeno H3K4me3 za pomoci PRDM9, výjimku tvoří pouze pseudoautozomální oblast chromozomu X a Y) (BRICK *et al.* 2012).

#### 2.2.4 *Prdm9* a jeho role v hybridní sterilitě

V roce 2009 byl identifikován první gen hybridní sterility u myši, jímž je *Prdm9* (MIHOLA *et al.* 2009). Ačkoliv dnes již mnohé víme o roli genu *Prdm9* v souvislosti s rekombinačními hotspoty, stále zůstává záhadou, jak se uplatňuje při hybridní sterilitě.

Rozsáhlá expresní studie potvrdila, že lokus na chromozomu 17, jenž se shoduje s genem *Prdm9*, je zcela nezbytný pro manifestaci sterilního fenotypu u hybridních potomků vzniklých křížením *Mus m. musculus* a *Mus m. domesticus* a interaguje s PWD alelou původu *Mus m. musculus* na chromozomu X. Gen *Prdm9* interaguje kromě chromozomu X i s dalšími autozomálními místy na chromozomech 2, 5 a 10 (TURNER *et al.* 2014). PRDM9 se pomocí repetice zinkových prstů váže k DNA, přičemž různé kmeny myši vykazují polymorfismus v délce a počtu zinkových prstů a tudíž i v umístění PRDM9 na DNA (GREY *et al.* 2011; BAUDAT *et al.* 2010). U hybridů by se PRDM9 nemusel být schopen správně vázat k DNA, anebo by se mohl uměle vázat do jiných míst v genomu. Metyltransferázová aktivita PRDM9 by mohla ovlivnit expresi genů, jež jsou zcela esenciální pro meiózu (MIHOLA *et al.* 2009). V důsledku odlišného *Prdm9* genotypu, odlišné prostorové nebo časové dostupnosti jeho produktu, dochází u F1 a F2 hybridů *Mus m. musculus* x *Mus m. domesticus* ke globální změně genové exprese. Hladiny 5 467 transkriptů byly deregulovány a to lze přičíst primárnímu vlivu interakcí *Prmd9* s osmi autozomálními místy a jedním X-vázaným lokusem. Odlišná exprese meiotických genů pak by mohla vést k deregulaci jejich produktů, v jejímž důsledku by průběh meiózy mohl být u hybridů narušen, či zastaven (TURNER *et al.* 2014).

Projevem a bezprostřední příčinou sterility u hybridních samců vzniklých křížením *Mus m. musculus* x *Mus m. domesticus* je asynapse homologních chromozomů v průběhu pachytenního stádia meiózy I (MIHOLA *et al.* 2009; BHATTACHARYA *et al.* 2013).

Heterospecifické homologní chromozomy u F1 hybridů (pocházející z různých (pod)druhů) mají tendenci k asynapsím. Důvod selhání párování heterospecifických chromozomů zřejmě tkví v tom, že jejich nekódující DNA, jenž má roli v synapsi homologních chromozomů, prodělává rychlejší evoluci a je tedy více odlišná. *Prdm9* a lokus na chromozomu X, popřípadě další autozomální lokusy, přímo nebo nepřímo ovlivňují párování a stabilitu heterospecifických chromozomů, čímž primárně způsobují zástavu spermatogeneze v pachytene (BHATTACHARYA *et al.* 2013).

### 2.2.5 Role chromozomu X v hybridní sterilitě

Z četných studií je zřejmé, že chromozom X hraje zcela esenciální roli v evoluci reprodukční izolace mezi příbuznými druhy. O jeho důležitosti vypovídá několik důkazů.

Jednak se při studiu samčích hybridů *Drosophila pseudoobscura* x *Drosophila persimilis*, kteří vznikli zpětným křížením, zjistilo, že přenos chromozomu X z jednoho druhu na pozadí druhého druhu má větší vliv na fertilitu, nežli přenos autozomu (COYNE a ORR 1989). Navíc geny související s genovou inkompatibilitou, jejímž důsledkem je sterilita u hybridů, jsou často mapovány na chromozom X (CHARLESWORTH *et al.* 1987; COYNE a ORR 1989; WU a DAVIS 1993).

Obecně se vliv chromozomu X na sterilitu označuje jako „velký efekt chromozomu X“ (large X-effect), respektive „Coynovo pravidlo“. Velký efekt chromozomu X lze vysvětlit několika hypotézami. Jednou z nich je teorie rychlejšího X („faster X theory“). Tato hypotéza je atraktivní i z toho důvodu, že pomocí ní lze vysvětlit Haldaneovo pravidlo. Dle této teorie rychlejší evoluci prodělávají geny na chromozomu X ve srovnání s autozomy, což vede k častější fixaci recesivních mutací na tomto chromozomu než na autozomech. Pokud vznikne tato recesivní mutace u samce na hemizygotním chromozomu X (chromozom X je u samce jen v jedné kopii), tak se takováto mutace vždy projeví, zatímco projev recesivní mutace na autozomu je v heterozygotním stavu maskován standardní alelou na sesterské chromatidě (CHARLESWORTH *et al.* 1987).

Další hypotéza, která by mohla ozřejmit proč má chromozom X tak velký vliv na sterilitu hybridních samců, zdůrazňuje vliv transkripčního umlčení chromozomu X a Y v průběhu meiotického dělení v pachytenních spermatocytech (tzv. meiotická inaktivace pohlavních chromozomů, MSCI, z angl. meiotic sex chromosomes inactivation) (CAMPBELL *et al.* 2013). Zcela zásadní pro inaktivaci chromozomu X v samičích somatických buňkách je nekódující RNA XIST (z angl. X inactivation specific transcript), která obaluje chromozom X, z kterého je exprimována a indukuje jeho transkripční umlčení navedením chromatin

modifikujících proteinů (BORSANI *et al.* 1991). Nicméně XIST zřejmě nehraje žádnou roli v MSCI (TURNER *et al.* 2002).

Již na počátku leptotene dochází masivně k dvouřetězcovým zlomům DNA s průměrným počtem 200 – 250 na myší spermatocyt. Odhad počtu dvouvláknových zlomů DNA byl stanoven za pomoci mikroskopické imunofluorescenční detekce faktorů pro opravu dvouvláknových zlomů RAD51 a DMC1, které jsou již v raném leptotene asociovány s DNA lézemi. Vznik dvouvláknových zlomů DNA je katalyzován proteinem SPO11. Reakcí na vznik těchto dvouřetězcových zlomů DNA je fosforylace histonu H2AX na serinu 139 tzv.  $\gamma$ -H2AX (MAHADEVIAH *et al.* 2001).  $\gamma$ -H2AX je signálem pro vazbu proteinů zapojených v dráze opravy DNA do místa zlomu (STUCKI *et al.* 2005). Během přechodu ze zygotene do pachytene však dochází k druhé vlně této fosforylace a podstupuje jí chromatin chromozomu X a Y. Autoři navrhli, že tato fosforylace je zcela zásadní pro umlčení pohlavních chromozomů, MSCI (MAHADEVIAH *et al.* 2001). ATR kináza (z angl. ataxia telangiectasia and Rad3 related) zajišťuje tuto fosforylaci H2AX a je proto zcela esenciální pro MSCI. Lokalizace ATR kinázy na chromozom X a Y je závislá na tumor supresorovém proteinu - BRCA1 (z angl. breast cancer 1) (TURNER *et al.* 2004). Po zahájení MSCI jsou chromozomy X a Y dále posttranslačně modifikovány (ubiquitinace histonu H2A, deacetylace histonu H3 a H4, dimetylace H3K4 a sumoylizace). Tyto modifikace pravděpodobně slouží k udržení MSCI. Průběh MSCI je závislý také na inkorporaci specifických histonových variant (H2AFY a H2AZ), které mají funkci převážně v udržení stability tohoto procesu (shrnutí v TURNER 2007).

Umlčení pohlavních chromozomů probíhá obecným meiotickým mechanismem umlčení transkripce asynapsovaného chromatinu MSUC (z angl. meiotic silencing of unsynapsed chromatin). Většina chromatinu X a Y spolu totiž nepáruje, až na krátkou pseudoautozomální oblast. Obecně u myší, ale i u lidí, je asynapse (narušení párování homologních chromozomů) asociována s meiotickou zástavou a sterilitou (HOMOLKA *et al.* 2012; shrnutí v TURNER 2007). Dvouvláknové zlomy DNA mohou být opraveny v průběhu pachytene rekombinací a předpokladem pro tuto událost je synapse mezi homologními chromozomy. Pokud homologní chromozomy nepárují, jsou asynapsované, tak nebudou ani opraveny dvouvláknové zlomy DNA. U kvasinek byl popsán pachytenní kontrolní bod (tzv. „checkpoint“), který zodpovídá za správný průběh rekombinace a kompletní synapsi chromozomů v průběhu pachytene. V odpovědi na nesprávný průběh těchto procesů poté

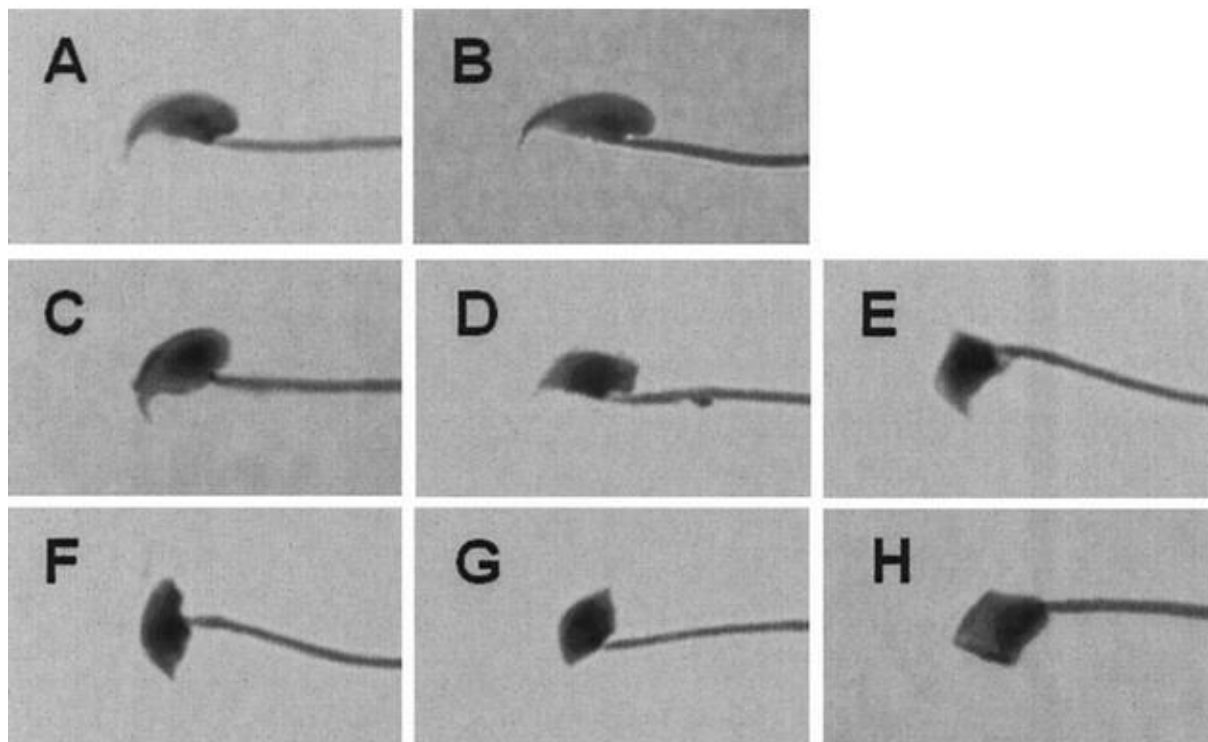
spouští zastavení, nebo zpoždění gametogeneze v defektních buňkách. Zabrání tak vzniku nebalancovaných gamet (shrnuje v ROEDER a BAILIS 2000).

Již dříve bylo navrženo, že narušení procesu MSCI by mohlo být příčinou hybridní sterility (FOREJT 1996) a také sterility chromozomové (HOMOLKA *et al.* 2007). Na tuto hypotézu se soustředili i Campbell s kolegy a prokázali, že výsledek selhání MSCI je pak příčinou zástavy meiotického dělení, apoptóza postižených buněk a nepřítomnost post-meiotických buněk. Pachytenní spermatocyty hybridních samců vykazovaly expresi X-vázaných genů, a tudíž chromozom X u nich zřejmě unikl inaktivaci. Toto selhání umlčení chromozomu X ale není zcela kompletní, neboť velice malá frakce germinálních buněk prošla meiózou a spermiogenezí. Vzniklé spermie však vykazovaly abnormality (CAMPBELL *et al.* 2013). Porucha MSCI tedy může být přímým důsledkem inkompatibilní interakce dle D-M modelu mezi autozomálním lokusem a chromozomem X. Navíc je známo, že některé autozomální geny jsou zcela zásadní pro MSCI (například gen *Brca1*). Doposud ale nebyly určeny lokusy na chromozomu X, jejichž inkompatibilní interakce s autozomálními geny by vedla u hybridů k narušení MSCI. Přesto MSCI unikají některé „microRNA“ (miRNA) (SONG *et al.* 2009). miRNA by tak mohly hrát zcela zásadní roli v MSCI (SONG *et al.* 2009; CAMPBELL *et al.* 2013).

Další přesvědčivý důkaz významu chromozomu X v hybridní sterilitě přinesly studie zapojující různé křížence myši *Mus m. musculus* x *Mus m. domesticus* (GOOD *et al.* 2008a; GOOD *et al.* 2008b; WHITE *et al.* 2010; FLACHS *et al.* 2014). Studie z roku 2008 (GOOD *et al.* 2008a) využila pro křížení laboratorní inbrední kmeny (křížení bratr sestra po několik generací) a outbrední kmeny (nepříbuzné křížení). Studie prokázala, že sterilita u hybridů následuje jednoznačně asymetrii, tedy že závisí na směru křížení (závisí tedy na původu matky a otce). Samci kříženců jsou heterozygotní pro autozomy, ale nesou chromozom X pocházející z jednoho, nebo druhého kmene podle původu matky. Kříženci, kteří vznikli křížením samice PWK/Ph (dále jen PWK) (*Mus m. musculus*) se samcem WSB/EiJ (dále jen WSB), nebo LEWES/EiJ (dále jen LEWES) (*Mus m. domesticus*), vykazovali výraznější snížení váhy *testes* a počtu spermií než kříženci jejichž otec byl PWK a matka WSB, nebo LEWES. Chromozom X kmene PWK tedy nese jeden inkompatibilní lokus (GOOD *et al.* 2008a).

Pro studium vlivu chromozomu X na hybridní sterilitu byly připraveny kmeny, jež nesly chromozom X původu *Mus m. musculus* z kmene PWD na pozadí B6J (tzv. konzomické kmeny). Chromozom X<sup>PWD</sup> byl přenesen na B6J pozadí opakovaným zpětným křížením

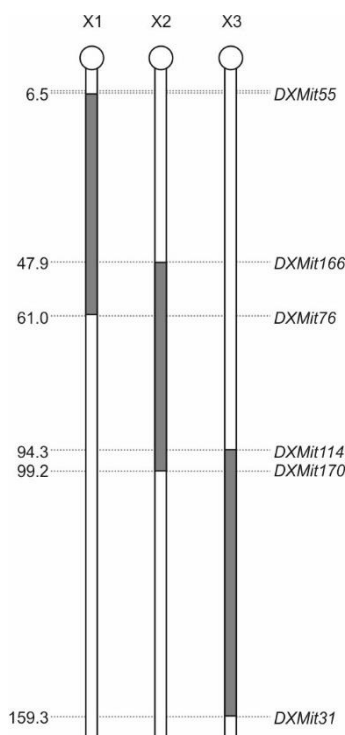
potomků s rodičovským kmenem – B6J („backcross“). Přenášený chromozom X musel být nerekombinantní, a proto musel být u potomků vždy genotypován pomocí MIT markerů. Samice B6J- $X^{PWD}X^{B6}$  byly plně fertilní, ale samci B6- $X^{PWD}Y^{B6}$  vykazovali snížení váhy *testes* (cca 149 mg, počet spermií (cca 12 mil/ml)). Navíc spermie samců B6J- $X^{PWD}Y^{B6}$  vykazovaly morfologické abnormality tvaru hlavičky (viz obrázek 6.) (STORCHOVÁ *et al.* 2004).



Obrázek 6.: **Příklady morfologických abnormalit hlaviček spermií u B6- $X^{PWD}Y^{B6}$ .** A) kontrolní hlavička B6J kmene, B) kontrolní hlavička PWD kmene, C) mírně kratší háček D-F) zkrácení háčku nebo zkrácení distální části hlavičky, G) vějířovitý tvar hlavičky, H) kosočtvercový tvar hlavičky. Převzato z STORCHOVÁ *et al.* (2004).

Pozorovaný semifertilní fenotyp musí být výsledkem interakce chromozomu  $X^{PWD}$  a genu v genetickém pozadí B6J. Analýzou rekombinantního chromozomu X u sterilních a fertilních samců a analýzou QTL, kterou se sledovaly parametry fertility (počet potomků, morfologické abnormality tvaru hlavičky, váha *testes* a počet spermií) ve vztahu ke genotypu, byl určen lokus zodpovědný za tento fenotyp na chromozomu X - *Hstx1*. Tento lokus zodpovídá za abnormalitu spermií a nachází se v centrální části chromozomu X (blízko MIT markerů - *DXmit119*). Aby se projevil semifertilní (částečně fertilní) fenotyp, který pozorujeme u konzomického kmene B6J- $X^{PWD}Y^{B6}$ , byly nutné ještě další lokusy na chromozomu X (STORCHOVÁ *et al.* 2004). Ukázalo se, že myši konzomického kmene nesoucí intaktní chromozom  $X^{PWD}$  se nerozmnožovaly dostatečně efektivně, a proto byly připraveny tzv.

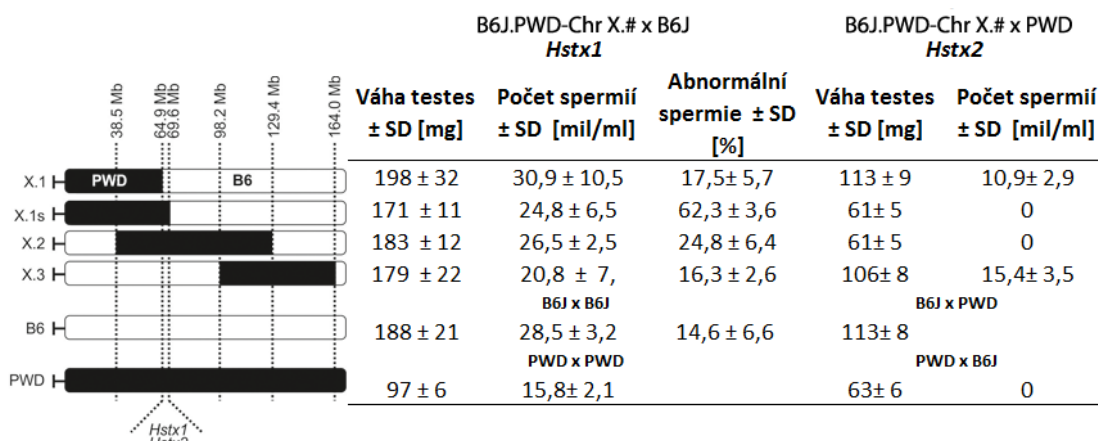
parciální (sub)konzomické kmeny nesoucí vzájemně se překrývající proximální, mediální a distální část chromozomu  $X^{PWD}$  (viz obrázek 7.) (GREGOROVÁ *et al.* 2008).



Obrázek 7.: **Schéma chromozomu X u parciálních (sub)konzomických kmenů.** Šedé intervaly představují PWD oblasti na B6J chromozomu X. Hranice PWD genomické oblasti byla mapována pomocí SNP (z angl. single nucleotid polymorphismus). Vytvořeno podle GREGOROVÁ *et al.*(2008).

Křížením konzomických samic B6J.PWD-Chr X x B6 s PWD získali autoři samce, kteří byli heterozygotní pro autozomy, ale nesli lokus hybridní sterility na chromozomu X buď z PWD, nebo z B6J v závislosti na rekombinačním zlomu. Pomocí analýzy QTL, která hledala korelaci mezi genotypem myši pomocí MIT markerů a parametry fertility – váha *testes* a počet spermií, byl určen nový lokus hybridní sterility na chromozomu X – *Hstx2*. Samci, kteří obdrželi alelu z PWD v oblasti *DXMit87*, vykazovali úplnou sterilitu (malá váha *testes* okolo 61 mg a žádné spermie v *epididymis*). Pro zúžení kritické oblasti byl dále připraven nový subkonzomický kmen B6J.PWD-Chr X.1s. Ten se od B6J.PWD-Chr X.1 lišil prodloužením proximálního intervalu chromozomu  $X^{PWD}$ . Hranice přenášené PWD sekvence chromozomu X byla porovnána s existujícími subkonzomickými kmeny, které nesly chromozom  $X^{PWD}$  z proximální, centrální a distální části, pomocí vysoce rozlišovacích myších DNA čipů (Mega Mouse Universal Genotyping Array (<http://www.neogen.com/Genomics/MUGA.html>)). Pro upřesnění pozice *Hstx2* byly kříženy parciální konzomické kmeny s PWD. Konkrétně (B6J.PWD-Chr X.1 x PWD), (B6J.PWD-Chr X.1s x PWD), B6J.PWD-Chr X.2 x PWD), (B6J.PWD-Chr X.3 x PWD) (viz obrázek 8.). B6J.PWD-Chr X.1 x PWD

a B6J.PWD-Chr X.3 x PWD vykazovali semifertilní fenotyp (váha *testes* cca 113 mg, se spermii v *epididymis*) podobný tomu, který pozorujeme u (B6J x PWD)F1. Oproti tomu B6J.PWD-Chr X.1s x PWD a B6J.PWD-Chr X.2 x PWD vykazovali plnou manifestaci sterilního fenotypu (váha *testes* 63 mg a bez spermií v *epididymis*) včetně zástavy v profázi meiózy I srovnatelnou s (PWD x B6J)F1 (viz obrázek 8.).



Obrázek 8.: Mapování míst *Hstx1* a *Hstx2* na chromozomu X použitím parciálních konzomických kmenů. Samice parciálních konzomických kmenů B6J.PWD-Chr X# byly kříženy se samci inbredních kmenů PWD a B6J. Hybridi, kteří vznikli z tohoto křížení, byli následně fenotypováni na váhu *testes* a počet spermií (viz tabulka napravo). Hranice přenášené PWD sekvence (černý obdélník) byla určena pomocí MegaMUGA (Mega Mouse Universal Genotyping Array) Porovnáním genotypu a fenotypu samců byly určeny lokusy hybridní sterility- *Hstx1* a *Hstx2*. Vytvořeno podle BHATTACHARRYA *et al.* (2014).

*Hstx2* u F1 hybridů kontroluje zástavu v pachytene v průběhu meiózy I. Proti tomu *Hstx1*<sup>PWD</sup> na B6J pozadí ovlivňuje post-meiotické fáze a vede k abnormalitám v morfologii hlaviček spermií. Pro určení lokusu - *Hstx1* byli fenotypováni samci všech čtyř parciálních konzomických kmenů B6J.PWD-Chr X.1, B6.PWD-Chr X.1s, B6J.PWD-Chr X.2, B6J.PWD-Chr X.3. Ukázalo se, že samci nesoucí chromozomální úsek X.1s z PWD vykazovali vyšší procento abnormálních spermií nežli samci ostatních parciálních konzomických kmenů. Tudíž lokus *Hstx1* leží ve stejné oblasti jako lokus *Hstx2* a to na chromozomu X v úseku dlouhém 4,7 Mb. Samci B6J.PWD-Chr X.2, ale nevykazovali vyšší procento abnormálních spermií ve srovnání s ostatními parciálními konzomickými kmeny, proto autoři usuzují, že *Hstx1* potřebuje pro projev abnormální morfologie hlaviček spermií interakci s dalším lokusem z X<sup>PWD</sup>.

V oblasti dlouhé 4,7 Mb na chromozomu X se nachází jedenáct protein kódujících genů a dvacet miRNA genů. Kandidátní geny *Hstx1* a *Hstx2* musí splnit dvě kritéria a to: expresi v *testes* a polymorfismus mezi PWD a B6J alelou v kódující oblasti. Dle těchto kritérií bylo vybráno sedm protein kódujících genů *Ctag2* (z angl. Cancer/testis antigen 2), *4930447F04Rik* (z angl. RIKEN cDNA 4930447F04 gene), *Slitrk2* (z angl. SLIT and NTRK-like family, member 2), *4933436I01 Rik* (z angl. RIKEN cDNA 4933436I91 gene), *Fmr1* (z angl. fragile X mental retardation 1 homolog), *Fmr1nb* (z angl. fragile X mental retardation 1 neighbor), *Aff2* (z angl. AF4/FMR2 family member 2). Viz tabulka 1. (BHATTACHARRYA *et al.* 2014).

Tabulka 1.: **Kandidátní geny *Hstx1* a *Hstx2*.** Vytvořeno podle BHATTACHARRYA *et al.* (2014).

gen	PWD/B6J SNP	genová exprese
<i>4933436I01Rik</i>	7	post-meiotická
<i>4930447F04Rik</i>	1	post-meiotická
<i>Aff2</i>	5	rané meiotické profázi I
<i>Ctag2</i>	1	post-meiotická
<i>Gen pro miRNA 743</i>	1	meiotické profázi I
<i>Fmr1</i>	0	rané meiotické profázi I
<i>Fmr1nb</i>	2	meiotické profázi I
<i>Slitrk2</i>	2	post-meiotická

Gen *Ctag2* má pouze jednu transkripční variantu a skládá se ze tří exonů (celková délka sekvence - 854 bp). Gen kóduje protein o délce 219 AMK (s využitím <http://www.ensembl.org/>). CTAG2 patří mezi testikulární rakovinné antigeny, které jsou charakterizovány jako imunogenní antigeny s expresí omezenou na testikulární germinální buňky v malignitách (shrnutí v SIMPSON *et al.* 2005). Představují tak účinný cíl pro imunoterapii nádorů. Fyziologická funkce genu *Ctag2* je doposud neznámá (HEMMINGER *et al.* 2014).

Gen *4930447F04Rik* má pouze jednu transkripční variantu a je tvořen dvěma exony (703 bp). Protein kódovaný tímto genem je dlouhý 126 AMK. O fyziologické funkci genu není doposud nic známé (s využitím <http://www.ensembl.org/>).

Délka sekvence genu *4933436I91Rik* je 1 426 bp (dva exony). Protein vznikající expresí tohoto genu je dlouhý 429 AMK. O fyziologické funkci genu *4933436I91Rik* doposud nejsou žádné informace (s využitím <http://www.ensembl.org/>).

Gen *Slitrk2* má dvě transkripční varianty. První (7 769 bp) kóduje protein o délce 846 AMK a druhá (2 992 bp) kóduje protein také o délce 846 AMK. *Slitrk2* patří do rodiny



Slitrk. Rodina těchto proteinů se skládá z šesti strukturně příbuzných 1x procházejících transmembránových proteinů (SLITRK 1-6). V extracelulární oblasti se nachází dvě konzervované domény, jež jsou na leucin bohaté, tzv. LRR doména (z angl. Leucin-rich repeat domain), která je obklopená doménou bohatou na cystein. LRR doména je zapojena v protein-proteinové interakci. Geny kódující jednotlivé členy jsou lokalizované u myši na chromozomech 3, 14 a X. Všechny geny *Slitrk* mají pouze jeden protein kódující exon. SLITRK proteiny jsou dominantně exprimované v centrálním nervovém systému (ARUGA a MIKOSHIBA 2003), dále také v hematopoetických, leukemických buňkách a embryonálních kmenových buňkách (shrnutí v PROENCA *et al.* 2011). SLITRK kontrolují růst neuritů (axonů a dendritů) (ARUGA a MIKOSHIBA 2003). Dále hrají roli ve formování synapse, podpoře přežití neuronů a morfogeneze dendritů. Navíc mutace genu *Slitrk2* byla nedávno asociována s neuropsychiatrickým onemocněním – schizofrenií (shrnutí v PROENCA *et al.* 2011).

Alternativním sestřihem genu *Fmr1* je generováno třináct variant transkriptů, přičemž protein kódujících je šest. Nejdelší varianta (4 409 bp) obsahuje sedmáct exonů a kóduje protein o délce 614 AMK (s využitím <http://www.ensembl.org/>). Ztráta exprese tohoto genu je asociována s tzv. syndromem fragilního X. Jedná se o X-vázané dominantní onemocnění s incidencí 1 : 4 000 u mužů a 1 : 6 000 u žen (TURNER *et al.* 1996). Projevem tohoto syndromu u lidí je kromě mentální retardace také makroorchidismus (abnormální zvětšení varlat), autistické chování a atypické faciální rysy (velké uši, protáhlý obličej a hrubé rysy) (shrnutí v TAMANINI *et al.* 1997). V 5' nepřekládané oblasti genu *Fmr1* (UTR – z angl. untranslated region) se nachází polymorfní CGG repetice, jež je shodná s tzv. FRAXA (folát senzitivní fragilní místo na chromozomu X). Příčinou syndromu fragilního X je poté expanze této CGG repetice v 5' nepřekládané oblasti (VERKERK *et al.* 1991). Pokud repetice expanduje do více než 230 trinukleotidů CGG, pak promotorová oblast bude hypermetylovaná, což má za následek umlčení transkripce, tedy absenci proteinu. FMR1 je exprimován ve většině tkání, ale vysokou expresi vykazuje v mozku a *testes* (spermatogonie a ranější stádia spermatogeneze) (TAMANINI *et al.* 1997). Protein je vysoce konzervován u obratlovců a je lokalizován v cytoplazmě a minoritně byl identifikován i v nukleoplazmě (gen obsahuje jak jaderný lokalizační signál, tak i jaderný exportní lokalizační signál). Gen *Fmr1* obsahuje dva sekvenční motivy pozorovaných v RNA vazebných proteinech (doména homologní k ribonukleoproteinu K a klastr argininových a glycinových zbytků), a proto by mohl být zapojen v RNA metabolismu. Navíc pomocí elektronové mikroskopie byla pozorována asociace FMR1 proteinu s ribozomem. Mohl by tak hrát roli v transportu RNA nebo ribozomálních partikulí

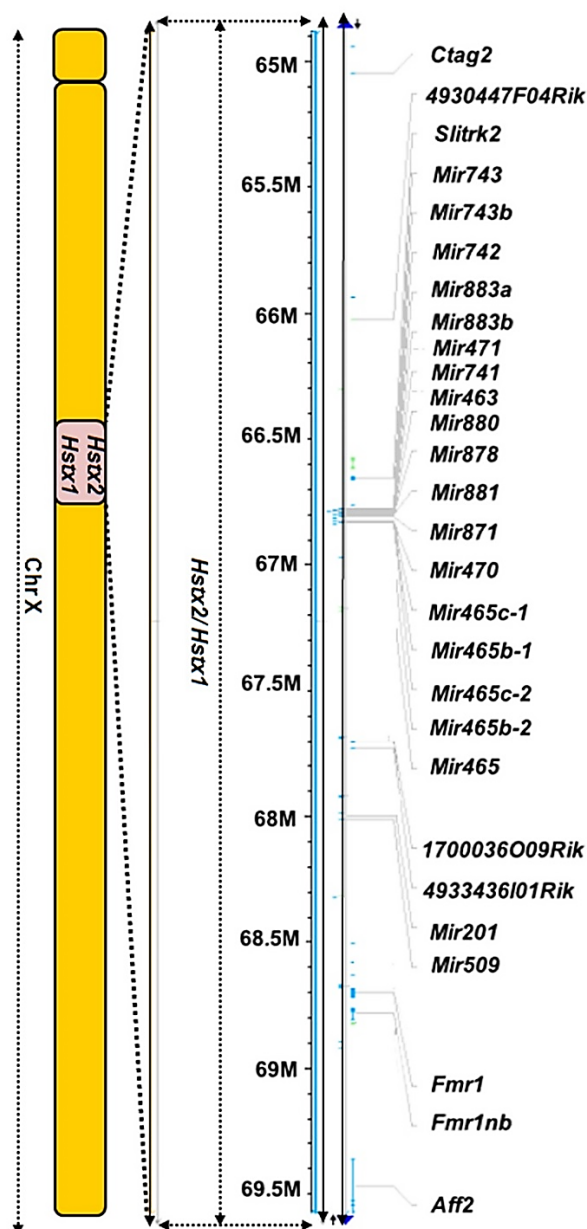
mezi jádrem a cytoplazmou a v regulaci translace a obratu těchto RNA (shrnutí v TAMANINI *et al.* 1997).

Gen *Aff2/Fmr2* (z angl. Fragile X mental retardation 2 homolog) má čtyři transkripční varianty, přičemž protein kódující je pouze varianta dlouhá 4 523 bp (dvacet exonů) a její translací vzniká protein o délce 1 272 AMK (s využitím <http://www.ensembl.org/>). Gen *Aff2*, respektive *Fmr2*, je vysoce konzervován u savců (77% identita v nukleotidové sekvenci mezi lidským a myším genem) a patří do rodiny proteinu AF4/FMR2. Protein se skládá z několika domén – N terminální domény, AF-4, LAF-4 a FMR2 homologní domény, na serin bohaté aktivační domény, nukleárního lokalizačního signálu a C terminální domény. Jedním z dalších folát senzitivních fragilních míst na chromozomu X je tzv. FRAXE (distálně od FRAXA), které je asociováno s mírnějšími projevy mentální retardace, schizofrenií, se zpožděním jazykového vývoje, autistickým chováním a hyperaktivitou (shrnutí v GU a NELSON 2003). Za fragilitu tohoto místa zodpovídá expanze CCG repetice. Gen *Aff2/Fmr2* je právě asociován s tímto fragilním místem (FRAXE) (GECZ *et al.* 1996). Doposud nelze ale říci, zdali existuje jednoznačný vztah mezi mentální retardací/FRAXE a absencí FMR2, neboť někteří pacienti, kteří neměli gen *Fmr2*, nevykazovali mentální retardaci. Existuje několik hypotéz vysvětlujících tento fenomén. Jednak mozaicismus v počtu repetice CCG a tudíž i metylaci. Gen *Aff2/Fmr2* mimo jiné hraje roli v raném embryonálním vývoji mozku a dalších tkání, a proto k expanzi repetice a hypermetylaci by mohlo docházet jen v raném vývoji, kdy je gen aktivní (shrnutí v GU a NELSON 2003). Myší modely delece genu *Fmr2* potvrdily, že produkt genu plní funkci v nervovém systému a paměti (shrnutí v GU a NELSON 2003).

Gen pro *microRNA 743*, lokalizován na chromozomu X v tzv. *microRNA* klastru, patří do rodiny malých endogenních RNA (20-21 nt), které vznikají z *miRNA* prekurzoru transkripce pomocí RNA polymerázy II z endogenních *miRNA* genů (*pri-miRNA*). *pri-miRNA* obsahuje sekundární strukturu, která je rozpoznávána RNázou III – Drosha, která je součástí komplexu dalších proteinů a tvoří společně tzv. mikroprocesor. *pri-miRNA* je štěpena tímto mikroprocesorem na tzv. *pre-miRNA* - vlásenku o délce 70 nt. Tento intermediát *miRNA* je exportován z jádra do cytoplazmy. V cytoplazmě je *pre-miRNA* štěpena další RNázou III tentokrát Dicer. Jednovláknová *miRNA* se váže na komplex RISC (z angl. RNA-induced silencing complex). *miRNA* je pak schopna regulovat expresi genů prostřednictvím translační represe nebo štěpením mRNA, ke které je komplementární (shrnutí v HUANG *et al.* 2011). Jakou mRNA *miRNA 743* reguluje a zdali vůbec má regulační funkci, není doposud známo.

Gen *Fmr1nb* se vyskytuje napříč eukaryotní říší (vyskytuje se například u člověka, šimpanze, gorily, myši, potkana, psa, kočky, prasete, ale i například slona atd.) a je jen málo konzervován (s využitím <http://www.ensembl.org/>). Má tři transkripční varianty dlouhé 842 bp, 799 bp a 679 bp. Všechny varianty dávají vzniknout proteinům a to o délkách: 238 AMK, 192 AMK a 166 AMK. Funkce FMR1NB nebyla doposud objasněna, ale je publikováno, že patří mezi testikulární rakovinné antigeny, které jsou charakterizovány jako imunogenní antigeny s expresí omezenou na testikulární germinální buňky (CAPPELL *et al.* 2012). O strukturních vlastnostech proteinu je dále pojednáno v kapitole 5.1 Výběr kandidátního genu. Ve své diplomové práci jsem se soustředila právě na ověření tohoto kandidátního genu. Gen *Fmr1nb* splňuje všechna kritéria (exprese v *testes* – s maximem v profázi meiózy I a polymorfismus mezi B6 a PWD alelou) (viz dále kapitola 5.1 Výběr kandidátního genu).

Umístění kandidátních genů v rámci chromozomu X zachycuje obrázek 9.



Obrázek 9.: Genová mapa kritické oblasti na chromozomu X obsahující kandidátní geny *Hstx1* a *Hstx2*. Převzato z BHATTACHARYYA *et al.* (2014).

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na ověření jednoho kandidátního genu hybridní sterility nacházejícího se na chromozomu X v lokusu *Hstx1* a *Hstx2* – genu *Fmr1nb*. Za tím to účelem byly vytvořeny deleční mutanti genu *Fmr1nb* pomocí TALE-nukleáz – TALEN (z angl. Transcription activator-like effector (TALE)nucleases) spolupráci s laboratoří prof. Sedláčka.

TALE-nukleázy představují unikátní nástroj pro cílenou modifikaci genů. TALEN se skládá z DNA vazebné domény a z endonukleázové domény. DNA vazebná doména se skládá ze čtyř variant 34 peptidových zbytků (TAL repetic), které zprostředkovávají vazbu k jednomu ze čtyř nukleotidů v cílovém místě DNA. Správnou kombinací TAL repetic, lze endonukleázu

specificky zacílit do cílového místa v genomu. Endonukleáza je reprezentována FokI nukleázovou doménou. *In vitro* transkribovaná mRNA (z angl. Messenger RNA) pro TALEN je injektována do jednobuněčného embrya. Po injekci jsou embrya inkubována do druhého dne do dvoubuněčného stádia a poté přeneseny do dělohy pseudopregnatní matky („náhradní matka“ – získaná po páření se samcem, u něhož byla provedena vasektomie – chirurgické přerušení chámovodů, akt páření u samice navodí hormonální změny, které jsou vhodné pro uhnízdění embrya v děloze). Po translaci mRNA TALENu je protein importován do jádra a indukuje zde dvouvláknové zlomy DNA, ty mohou být opraveny homologní rekombinací nebo nehomologní rekombinací. Výsledkem jsou myši s mutací v požadované sekvenci (WEFERS *et al.* 2013). Vzniklí potomci („founders“) jsou chimérickí z hlediska výskytu buněk s mutací a bez mutace. Pro ustavení mutantní linie je předpokladem transmise mutantní alely do germinální linie a její přenos na potomky zpětným křížením „founders“ s myšmi inbredního kmene B6N. V současné době jsou cílené manipulace genů TALEN metodou postupně nahrazovány CRISPR/Cas9 technologií, která je rychlejší a univerzálnější (CONG *et al.* 2013).

### 3 Cíle práce

Pro ověření role genu *Fmr1nb* v hybridní sterilitě byly stanoveny dva hlavní cíle:

**1. Ovlivní delece genu *Fmr1nb* v oblasti start kodonu ATG průběh samčí meiózy a spermiogeneze?** Za tímto účelem byli připraveni deleční mutanti genu *Fmr1nb* pomocí TALE-nukleáz, které byly cílené do start kodonu ATG v prvním exonu, s cílem vytvořit nulové mutanty genu *Fmr1nb*. Následně byly u mutantů analyzovány parametry fertility (váha *testes*, počet spermií v *epididymides* a morfologie spermií). Pro analýzu profáze meiózy I bylo použito imunocytologické značení vybraných meiotickým proteinů s cílem identifikovat jednotlivé stádia profáze meiózy I a asynapse. Pro získání detailnějšího vhledu do průběhu spermatogeneze byla provedena analýza histologických řezů.

**2. Jaký bude mít vliv delece *Fmr1nb* na průběh samčí meiózy a spermiogeneze u hybridních samců (B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1?** Za tímto účelem byly kříženy samice delečních linií genu *Fmr1nb* s PWD samci. Následně byli tito kříženci analyzováni na parametry fertility (váha *testes*, počet spermií v *epididymides* a morfologie spermií). Pro analýzu profáze meiózy I bylo použito imunocytologické značení vybraných meiotických proteinů. Průběh spermatogeneze byl také analyzován na histologických řezech.

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Chemikálie

Látka	Dodavatel/výrobce
Agaroza	Serva
Kyselina boritá	Lachema
Eosin Y	Lachema
Ethanol	Merck
Ethidium bromid (EtBr)	Sigma
Fenol	Serva
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma
Chloroform	Lachem
Isopropanol	Merck
Kozí sérum	EMD Millipore
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Serva
Mowiol (polyvinylalkohol)	Harco
Orange G	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	electron mikroskop science
Proteázové inhibitory	Roche
Sacharóza	Lachem
Tris (hydroxymetyl) aminometan (Tris)	Serva
Triton X-100	Sigma
Trizol reagent (trireagens)	Molecular research center
Xylen	Penta

#### 4.1.1 Pufry a roztoky

Látka	Dodavatel/výrobce
<b>0,1 M Sacharoza:</b> 1 M sacharoza, miliQ H <sub>2</sub> O, 1x proteázové inhibitory	
<b>0,5x konc. TBE:</b> 44,5 mM Tris, 44,5 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA	
<b>0,5x MAH- binding buffer:</b> 1,5% (w/v) BSA, 5% (w/v) kozí sérum, 0,05% (w/v) triton X-100	
<b>1% (w/v) PFA 0,15% (w/v) triton X-100:</b> 50 mM borát sodný (pH 9,2), 32% (w/v) PFA, 15% (w/v) triton X-100	
<b>10 mM Tri-HCl:</b> pH 7,5	
<b>20x konc. SSC:</b> 341 mM citrát sodný, 2,96 M NaCl	
<b>3 M Octan sodný</b>	Lachema
<b>5 mM Tris-HCl:</b> pH 8	
<b>50 mM Borát sodný:</b> pH 9,2	Lachem
<b>Bouin</b>	Penta
<b>Buffer PE:</b> Součástí QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen

<b>Buffer QX1 (s pH indikátorem):</b> Součástí QIAEX II® Gel Extraction Kit	Qiagen
<b>Cell Lysis Solution:</b> součástí Puregene® Core Kit A	Qiagen
<b>DNA Hydration Solution:</b> 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5: součástí Puregene® Core Kit A	Qiagen
<b>DNase incubation buffer:</b> 1M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl <sub>2</sub> , pH 7,0: Součástí High Pure RNA Tissue Kit	Roche
<b>Elution Buffer:</b> H <sub>2</sub> O, PCR Grade: Součástí High Pure RNA Tissue Kit	Roche
<b>Equilibration Buffer:</b> součástí kitu DeadEnd™ Fluorometric Tunel systém	Promega
<b>GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder</b>	Thermo Scientific
<b>Hematoxylin</b>	Sigma
<b>Hydroxid sodný (NaOH)</b>	Serva
<b>Chlorid sodný (NaCl)</b>	Lachem
<b>Lysis/Binding buffer:</b> 4,5 M guanidine-HCl, 100 mM fosfát sodný, pH 6,6: Součástí High Pure RNA Tissue Kit	Roche
<b>médium RPMI</b> (z angl. Roswell Park Memorial Institute medium)	Sigma
<b>Midori Green DNA stain</b>	Nippon Genetics
<b>PBS</b> (phosphate buffered saline): 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	ÚMG servisní pracovištěs
<b>Protein Precipitation Solution:</b> součástí Puregene® Core Kit A	Qiagen
<b>QIAEX II:</b> Součástí QIAEX II® Gel Extraction Kit	Qiagen
<b>TdT (terminální deoxynukleotid transferáza)</b>	Promega
<b>reakční mix:</b> součástí kitu DeadEnd™ Fluorometric Tunel systém	
<b>TE pH 8,0:</b> 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0	
<b>Vzorková nanášecí barvička:</b> 4,78 M Orange G, 25% (v/v) glycerol	
<b>Wash Buffer I:</b> 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 6,6: Součástí High Pure RNA Tissue Kit	Roche
<b>Wash Buffer II:</b> 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5: Součástí High Pure RNA Tissue Kit	Roche

#### 4.1.2 4.1.3 Enzymy

Látka	Dodavatel/výrobce
<b>DNáza I:</b> součástí High Pure RNA Tissue Kit	Roche
<b>Proteináza K:</b> součástí kitu DeadEnd™ Fluorometric Tunel systém	Promega
<b>Proteináza K:</b> součástí Puregene® Core Kit A	Qiagen



<b>Reverzní transkriptáza M-MLV</b> (z angl. Moloney Murine Leukemia Virus)	Promega
<b>RNasin</b> (ribonukleazový inhibitor)	Promega
<b>RNáza A:</b> součástí Puregene® Core Kit A	Qiagen
<b>Scientific Polymeráza LightCycler® FastStart</b>	Roche
<b>Taq DNA polymeráza</b>	Thermo

#### 4.1.3 Chemikálie pro PCR (polymerázovou řetězovou reakci), real-time RT-PCR, reverzní transkripci a sekvenování

Látka	Dodavatel/výrobce
<b>10x konc. reakční pufr s KCl:</b> 100mM Tris-HCl (pH 8,8 v 25°C), 500mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40	Fermentas
<b>25mM MgCl<sub>2</sub></b>	Fermentas
<b>10 mM dNTP (deoxyribonukleotid trifosfát) MIX</b>	Serva
<b>Náhodné hexaméry</b>	Invitrogen
<b>5x konc. First Strand Buffer:</b> reakční pufr 250mM Tris-HCl (pH8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen
<b>Dithiotreitol (DTT)</b>	Invitrogen
<b>Light cycler start reaction mix SYBR Green I</b>	Roche
<b>Terminator ready rection Mix:</b> součástí kitu: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied biosystems
<b>BigDye sekvenační pufr:</b> součástí kitu: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied biosystems

#### 4.1.4 PCR primery

Všechny sekvence primeru jsou psány v orientaci 5' → 3'

Tabulka 2.: Seznam použitých primerů, jejich sekvencí, délek ampikonu a teploty nasedání (T<sub>m</sub>).

Název	Sekvence 5' k 3'	Délka	
		ampikonu [bp]	T <sub>m</sub> [°C]
<b>Fmr1nb_D566_F2</b>	ATCCCGCAATACCTCTCCTG	900	60,0
<b>Fmr1nb_D566_R2</b>	ACCCCAATCACCTCCTTTT	900	60,0
<b>Fmr1nb_F2_22</b>	CAGGAGGTTCTGGACTGCTC	271	60,0
<b>Fmr1nb_R2_293</b>	TGAAGTCCAGAAGCCAAACC	271	60,2
<b>Fmr1nb_F2_51</b>	GGTGCGTCACTATCACCTCA	185	59,7
<b>Fmr1nb_R2_236</b>	CGGAGGCCCTGATACATAC	185	61,6
<b>Fmr1nbOuF</b>	ATCGGCAAGTGTATGGAA	589	56,1
<b>Fmr1rightBsrI</b>	TCACAGGACGGAACAGGAT	589	59,0
<b>Fmr1nb_UPL#25_F</b>	TCCTGGGATTTCTGCCTATG	72	60,0
<b>Fmr1nb_UPL#25_R</b>	CCTTCAACATCCTGTTCATCC	72	59,4
<b>Actb_UPL#64_F</b>	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	104	59,7
<b>Actb_UPL#64_R</b>	ACCAGAGGCATACAGGGACA	104	60,5

Tabulka 3.: Seznam primerů pro sekvenační reakci.

Název	Sekvence 5' k 3'	T <sub>m</sub> [°C]
<b>Fmr1nb_D566_F2</b>	ATCCCGCAATACCTCTCCTG	60,0
<b>Fmr1nb_D566_R2</b>	ACCCCAATCACCTCCTTTT	60,0
<b>Fmr1nb_F2_22</b>	CAGGAGGTTCTGGACTGCTC	60,0
<b>Fmr1nbOuF</b>	ATCGGCAAGTGTATGGAA	56,1

#### 4.1.5 Programy a databáze (Výrobce, nebo webová stránka)

**ENSEMBL:** <http://www.ensembl.org/>

**GeneSnap**      **Version**      **7.04:**      Prohlížeč      elektroforetických      gelů:

(<http://www.syngene.com/genesnap>)

**ImageJ:** (hodnocení imunocytochemických preparátů): <http://imagej.nih.gov/ij/>

**Instudio:** focení preparátů pod světelným mikroskopem

**LightCycler Software Version 3.5.3:** <http://lifescience.roche.com/shop/products/absolute-quantification-with-the-lightcycler-carousel-based-system>

**NCBI:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

**NIS elements BR 4.13.04 64 – bit:** (focení imunocytoologických preparátů):  
[http://www.nikon.com/products/instruments/lineup/bioscience/img\\_soft/](http://www.nikon.com/products/instruments/lineup/bioscience/img_soft/)

**NIS elements BR:** (hodnocení imunocytoologických preparátů):  
[http://www.nikon.com/products/instruments/lineup/bioscience/img\\_soft/](http://www.nikon.com/products/instruments/lineup/bioscience/img_soft/)

**Photoshop:** (úprava fotek)

**Predikce lokalizace proteinu:** <http://www.softberry.com/>

**Predikce transmembránových helixů:** <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

program pro statistické výpočty a tvorbu grafů: R Version 2.9.1

**PyRAT:** <https://pyrat.img.cas.cz>

**SeqMan Pro:** Analýza sekvenačních dat:

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Chov myši

V Ústavu molekulární genetiky Akademie věd (ÚMG) jsou myši ve zvěřinci chovány v bariérovém chovu (vstup a výstup materiálů i osob je takový, aby nedošlo k průniku patogenů z vnějšího prostředí). O myši je pečováno v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. K vedení chovu a ke komunikaci s personálem zvěřince je použita aplikace PyRAT (Python based Relational Animal Tracking), ve které jsou myši evidovány a kam lze mimo jiné zadat i požadavek pro odběr tkáně. V rámci diplomové práce jsem pracovala s několika myšími inbredními kmeny: PWD (PWD/Ph), B6J (C57BL/6J), B6N (C57BL/6N) a parciálními konzomickými kmeny: B6J.PWD-Chr X.1, B6J.PWD-Chr X.1s, B6J.PWD-Chr X.2.

Kmen PWD byl odvozen z divokých myši *Mus m. musculus* odchycených v okolí Prahy v roce 1972 a jejich inbredizací (GREGOROVA a FOREJT 2000). Myši inbrední kmen C57BL/6J byl dovezen v roce 1998 z The Jackson Laboratory v Bar Harbor, USA, nyní je kmen držen v ÚMG. V roce 1951 byl B6J přenesen do National Institutes of Health, čímž byla ustanovena B6N linie. Rozdíl mezi oběma kmeny odpovídá 34 SNP v kódující oblasti a 146 SNP mimo kódující oblast. Navíc se liší v přítomnosti několika inzerčních (delečních) mutací (SIMON *et al.* 2013). Příprava parciálních konzomických kmenů je popsána v kapitole 2.2.5 Role chromozomu X v hybridní sterilitě (GREGOROVÁ *et al.* 2008; BHATTACHARYA *et al.* 2014).

### 4.2.2 Pitva

Se zvířaty bylo zacházeno v souladu s § 15d odstavce 2 písmeno a) zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

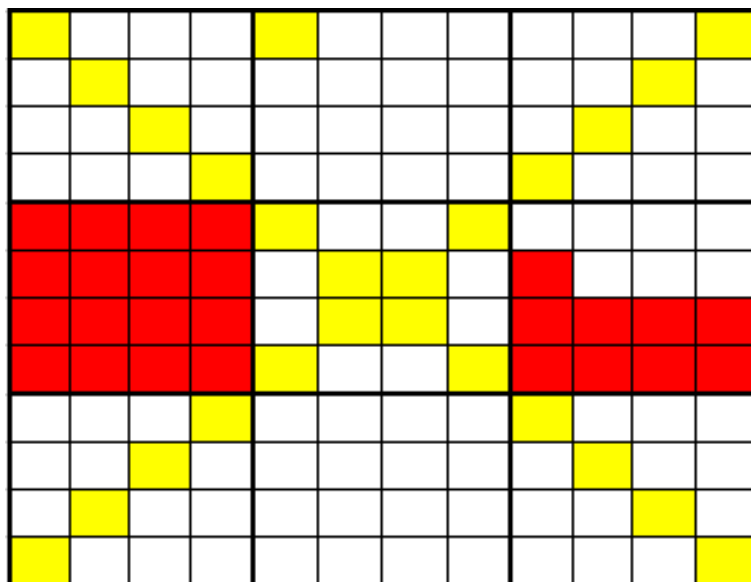
Myši byly uspány chloroformem a následně byla provedena dislokace krčních obratlů. Na vahách (váha Kern EG600-2M LABsystem) bylo zváženo celé tělo s přesností na jednu desetinnou čárku. Po otevření břišní dutiny byly vyňaty obě *testes* a zváženy na petriho misce s přesností na dvě desetinná místa. Jedno *testis* bylo zbaveno tuniky a rozpůleno. Jedna půlka byla umístěna do 1,5 ml centrifugační mikrozskumavky s 1 ml RPMI media. Tkáň byla poté zpracována pro imunocytologické preparáty. Druhá půlka byla vložena do 1,5 ml centrifugační mikrozskumavky a ihned zamražena v tekutém dusíku. Následně byla tato tkáň použita pro izolaci RNA. Druhé *testis* bylo umístěno do 1 ml fixačního roztoku Bouine. To bylo zpracováno následně pro histologické řezy varlat. Z myši byla vyňata obě *epididymides*, očištěna

od gonadální tukové tkáně a umístěny do 1 ml 1x konc. PBS. *Epididymides* byla rozstříhána pitevními nůžkami a využita pro stanovení počtu a morfologie spermií (hlavička s bičíkem). Z myši byla vyňata slezina a ihned zmrazena v 1,5 ml centrifugační mikrozskumavce v tekutém dusíku. Zkumavky s tkání byly vyňaty z tekutého dusíku a uskladněny v -80 °C.

### 4.2.3 Fenotypizace

#### 4.2.3.1 Stanovení počtu spermií

*Epididymides* byla rozstříhána pomocí pitevních nůžek v 1 ml 1x konc. PBS (cca 40 stříhů). Poté bylo se vzorkem silně zatřepáno pro uvolnění spermií z kanálků. Po 1 minutě, kdy byl vzorek ponechán v klidu, aby se vytvořila horní tuková vrstva, byl ze středu odebrán alikvot pro naředění suspenze spermií. U zcela fertálních jedinců byla suspenze spermií ředěna 1x konc. PBS 1:100 nebo 1:50. U hybridů byla suspenze spermií ředěna 1:10. Alikvot z naředěného vzorku byl nanesen do Bürkerovy počítací komůrky, která je rozdělená na 12 x 12 čtverců (o výšce 0,1 mm). Spermie (hlavička s ocáskem) asamotné hlavičky byly počítané pod světelným mikroskopem (Eclipse E200, Nikon) v obou diagonálách (12 + 12) + 1 čtvereček (viz žluté čtverečky obrázek 10.), dále v dalších 25 čtverečích (viz obrázek 10, červené čtverečky). Oba výsledky byly zprůměrovány a počet spermií v 1 ml (koncentrace spermií/ml) byl stanoven dle rovnice: průměrný počet spermií v 25 čtvercích x 10 000 x ředění.

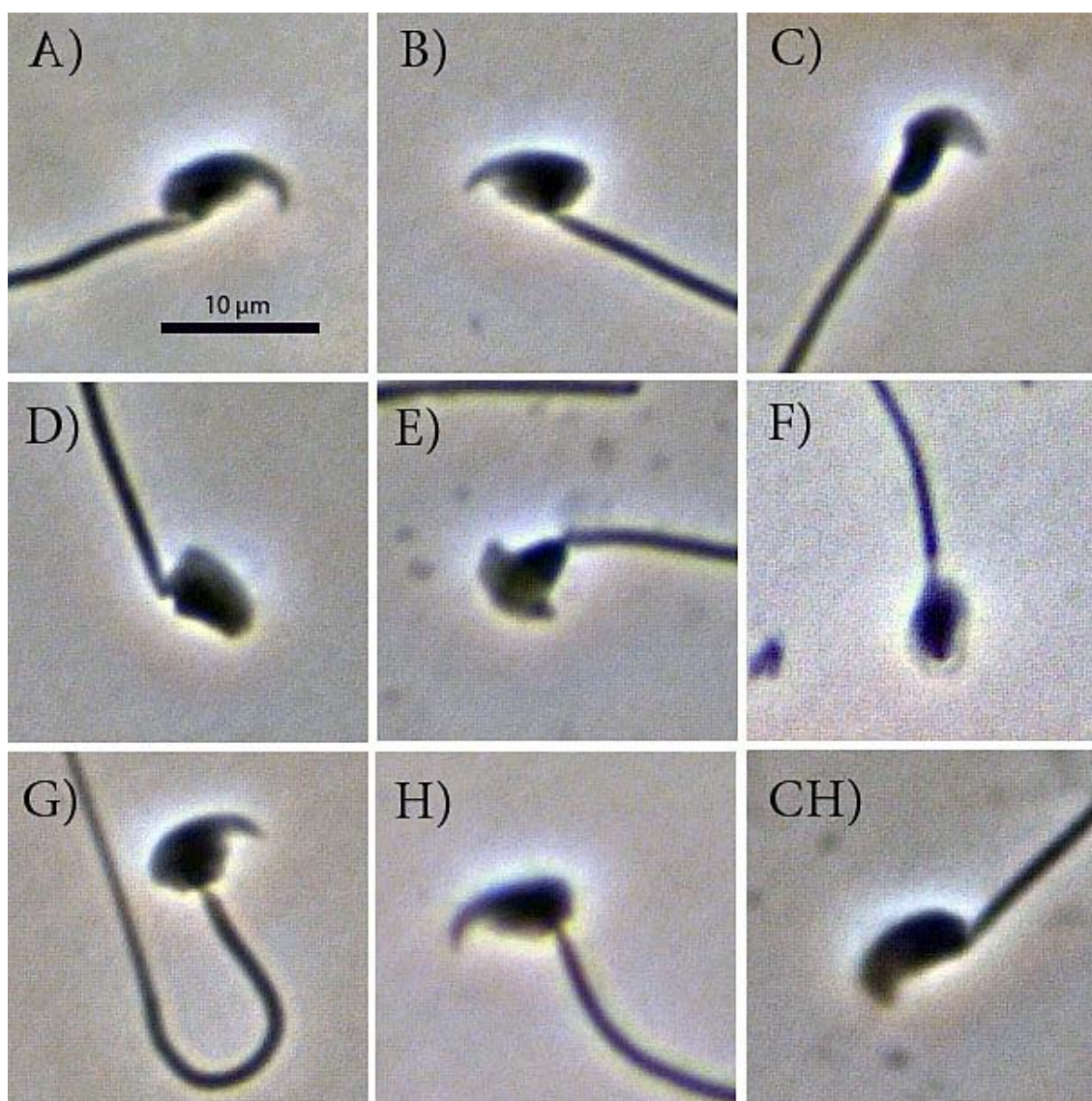


Obrázek 10.: Schéma Bürkerovy počítací komůrky 12 x 12 čtverců (o výšce 0,1 mm). Žluté a červené čtverečky představují počítané čtverečky pro stanovení počtu spermií.

#### 4.2.3.2 Stanovení malformací spermií

Rozstříhaná *epididymides* byla opětovně promíchána a ze středu spermiové suspenze bylo u fertilních jedinců odebráno 90  $\mu$ l do nové centrifugační mikrozkuhavky. K odebranému alikvotu bylo přidáno 90  $\mu$ l 1x konc. PBS a 20  $\mu$ l 1% (w/v) barviva eosin Y (ředění 1 : 9). Vzorek byl ponechán 45 minut při 4 °C. Následně se se vzorkem zatřepalo a bylo naneseno 20  $\mu$ l obarvené suspenze spermií na podložní sklo. Kapka byla rovnoměrně rozetřena krycím sklem po celé délce podložního skla. Roztěr se nechal sušit při pokojové teplotě cca 10 minut. Poté byl preparát opláchnut v ultračisté vodě (systém pro přípravu ultračisté vody Synergy UV, EMD Millipore) a nechán opětovně při pokojové teplotě uschnout. Na preparát bylo naneseno průhledné tvrdnoucí médium Mowiol. Obarvený preparát byl pozorován pod světelným mikroskopem (Eclipse E200, Nikon). U hybridů bylo odebráno 180  $\mu$ l spermiové suspenze a přidalo se rovnou 20  $\mu$ l 1% (w/v) barviva eosin Y (ředění 1 : 9). Dále bylo se vzorkem zacházeno jako u fertilních jedinců.

*Způsob odečítání:* Na mikroskopickém sklíčku bylo pro každou myš odečteno 100 spermií (hlavička s bičíkem). Spermie, které byly vyhodnoceny jako abnormální, byly vyfoceny (pomocí programu Instudio) a následně rozřazeny do tří kategorií: *malformace hlavičky* (extrémní malformace), *špatně nasedající bičík na hlavičku*, *malformace háčku*. Celková malformace spermií je výsledkem součtu malformovaných spermií ze všech tří kategorií. Příklady kategorií viz obrázek 11.



Obrázek 11.: **Morfologické strukturní abnormality spermií u B6.Fmr1nb<sup>mut</sup>.** A) standardní hlavička z B6N, B-G) malformace hlavičky (extrémní malformace), H) ocásek špatně nasedající na hlavičku, CH) malformace háčku.

#### 4.2.3.3 Imunocytoologické preparáty

Půlka *testis* po odstranění tuniky byla umístěna do 1 ml média RPMI v centrifugační mikrozkuhavce a důkladně roztřepána (cca 1 minutu). Po usazení semenotvorných kanálků (cca po 30 sekundách) bylo třepání ještě jednou zopakováno pro úplné rozvolnění buněk. Většina média RPMI byla odstraněna a vyměněna za 1 ml nového média RPMI. Opětovně se obsah mikrocetifugační zkuhavky promíchal. Médium RPMI bylo odebráno cca do půlky objemu centrifugační mikrozkuhavky. Vzorek byl centrifugován při pokojové teplotě při 100 rcf po dobu 30 sekund (mikrocetifuga, Eppendorf 5415D). Zbytek média RPMI byl odebrán. Ke tkáni bylo přidáno 100  $\mu$ l nového média RPMI. Pomocí pitevních nůžek byla tkáň rozstříhána na drobné kousky. Po rozstříhání bylo médium RPMI doplněno do 1 ml.

Buněčná peleta byla pomocí pipetmana nasávána a uvolňována a to 10x. Buněčná suspenze byla za pomoci síta (BD Falcon 40  $\mu\text{m}$  cell strainer) přefiltrována do nové centrifugační mikrozkuhavky. Podložní skla, na která se později kapala buněčná suspenze, se nechala vychladit při 4 °C ve vlhké komůrce (podložní skla byla umístěna na skleněnou podložku, která ležela na navlhčené buničině v uzavřené plastové nádobě). Z přefiltrované buněčné suspenze bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  a naředěno 1 : 20 médiem RPMI. Alikvot z naředěné buněčné suspenze se po promíchání nanese na Bürkerovu počítací komůrku rozdělenou na 12 x 12 čtverců (o výšce 0,1 mm). Všechny buňky (spermatocyty, spermatidy) kromě spermií byly spočteny v obou diagonálách (12 + 12) + 1 čtvereček. Počet buněk byl pak určen podle rovnice: počet buněk v 25 čtvercích x 10 000 x ředění = koncentrace buněk/ml. Z přefiltrované buněčné suspenze byl po promíchání odebrán příslušný alikvot, aby na jedno sklo bylo naneseno 250 000 buněk. K buněčné suspenzi bylo pro jedno sklíčko přidáno 100  $\mu\text{l}$  0,1 M sacharózy s 1x konc. proteazovými inhibitory. Suspenze byla velice opatrným převrácením promíchána a byla ponechána při 0 °C po dobu 12 minut. Na předchlazená podložní skla bylo naneseno 150  $\mu\text{l}$  1% (w/v) PFA. Po velice pomalém a šetrném převrácení byla z 30 cm nakapaná buněčná suspenze na podložní skla s 1% PFA (w/v) (přes ustřiženou špičku). V důsledku nárazu buněk na plochu skla došlo k prasknutí cytoplazmatické membrány a obnažení jádra. Preparáty se ve vlhké komůrce nechaly inkubovat 3 hodiny při 4 °C. Po 3 hodinách byla skla opláchnuta v histologické kyvetě s ultračistou vodou (5 sekund) a nechána schnout při pokojové teplotě. Skla byla po 20 minutách umístěna do histologické kyvety s 1x konc. PBS na 5-8 minut, aby došlo k opětovné renaturaci preparátu. Na podložní skla (na stranu, kam byla nakapána buněčná suspenze) bylo naneseno 100  $\mu\text{l}$  0,5x konc. MAH pufru a přiložila se krycí skla. Preparáty se nechaly inkubovat při 4 °C 1 hodinu ve vlhké komůrce (nádobu od 1 000  $\mu\text{l}$  špiček s destilovanou vodou - dH<sub>2</sub>O). Po inkubaci se z podložních skel nechala gravitací sklouznout krycí skla a na podložní skla byly naneseny primární protilátky ředěné v roztoku MAH pufru (0,5x konc.) a přiložena krycí skla (ředění primárních protilátek viz tabulka 4.). Preparáty se nechaly inkubovat při 4 °C 16 hodin ve vlhké komůrce (nádobu od 1 000  $\mu\text{l}$  špiček s dH<sub>2</sub>O).



Tabulka 4. Seznam primárních protilátek.

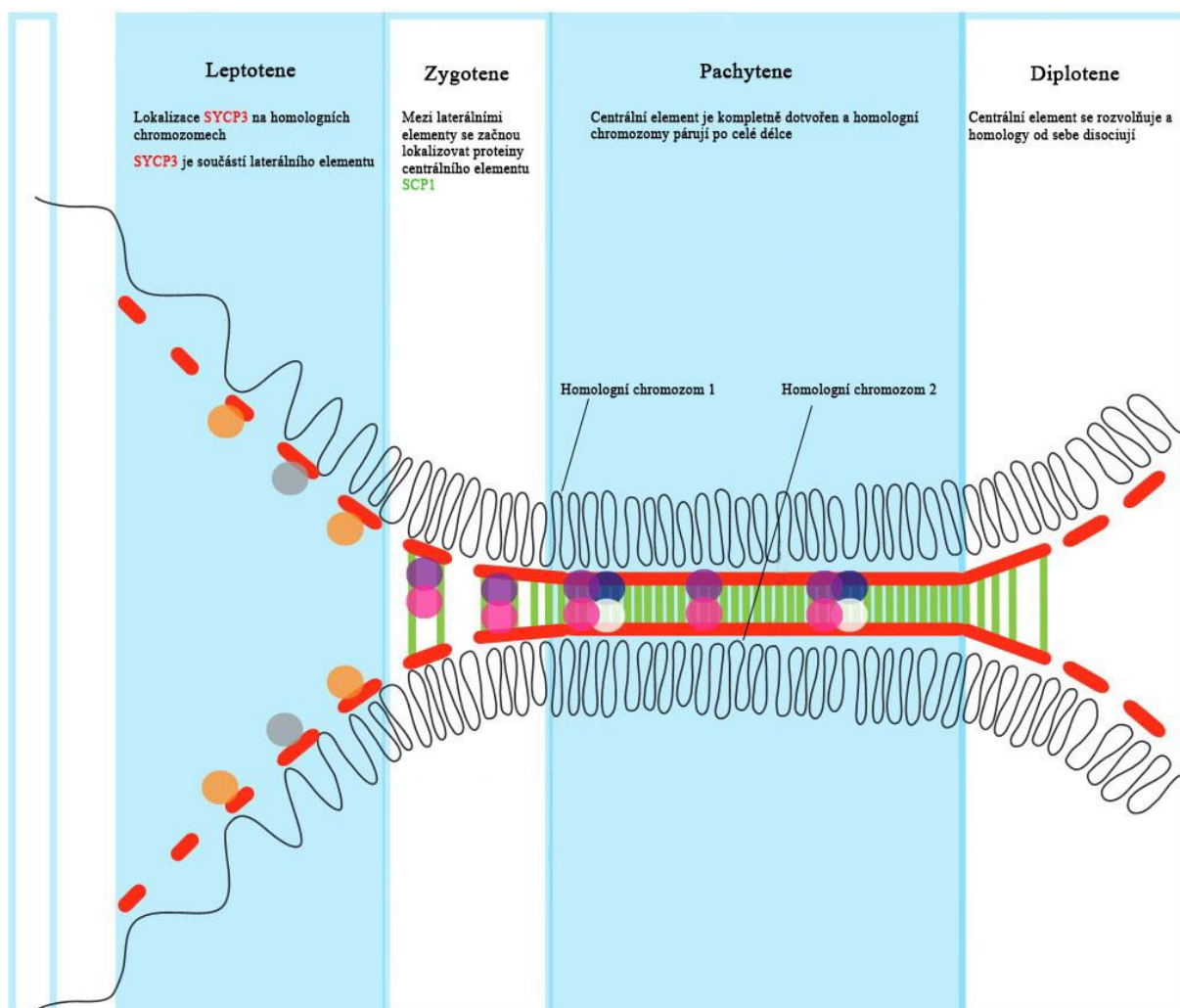
<i>název protilátky</i>	<i>sériové číslo</i>	<i>výrobce</i>	<i>ředění</i>
<b>myší protilátka proti SYCP3</b>	sc74569	Santa Cruz biotechnology	1:100
<b>králičí protilátka proti gH2AX</b>	ab2893	Abcam	1:500
<b>morčecí protilátka proti H1t</b>		od Marry Ann Handel	1:700
<b>králičí protilátka proti HORMAD2</b>	sc82192	Santa Cruz biotechnology	1:50
<b>myší protilátka proti MLH1</b>	ab14206	Abcam	1:20
<b>myší protilátka proti SYCP1</b>	ab15087	Abcam	1:500
<b>lidská protilátka proti centromerickým proteinům</b>	Inc15235	Antibodies incorporated	1:200

Druhý den se z podložních skel nechala gravitací sklouznout krycí skla a umístila se do histologické kyvety s 1x konc. PBS na 10 minut při pokojové teplotě. Poté bylo 1x konc. PBS vyměněno za čerstvé a postup se ještě 2x zopakoval. Přičemž skla, na která byla nanášena stejná kombinace primárních protilátek, byla umístěna do společné histologické kyvety. Z 1x konc. PBS byla skla vyndána, lehce osušena ze spodní strany (tam, kde nebyla nakapána buněčná suspenze) a následně na ně byly nanášeny sekundární protilátky ředěné v roztoku MAH pufru (0,5x konc.) a přiloženy krycí skla. Seznam použitých sekundárních protilátek a jejich ředění je shrnut v tabulce 5. Preparáty se nechaly inkubovat 2 hodiny při 4 °C ve vlhké komůrce (nádoba od 1 000 µl špiček s dH<sub>2</sub>O). Po 2 hodinách se z podložních skel nechalo gravitací sklouznout krycí skla. Podložní skla byla umístěna do 1x konc. PBS na 10 minut při pokojové teplotě. Poté se 1x konc. PBS vyměnilo za nové a postup se zopakoval ještě 2x. Tyto kroky musely probíhat za tmy. Po posledním oplachu byla skla lehce osušena ze spodní strany a bylo přidáno 25 µl montovacího media (Vectashield MM with DAPI H-1200) a přiloženo krycí sklo. Preparáty byly skladovány maximálně 7 dní při 4 °C a následně zamraženy při -20 °C. Preparáty byly pozorovány pod imunofluorescenčním mikroskopem (Eclipse E400, Nikon).

Tabulka 5.: Seznam použitých sekundárních protilátek

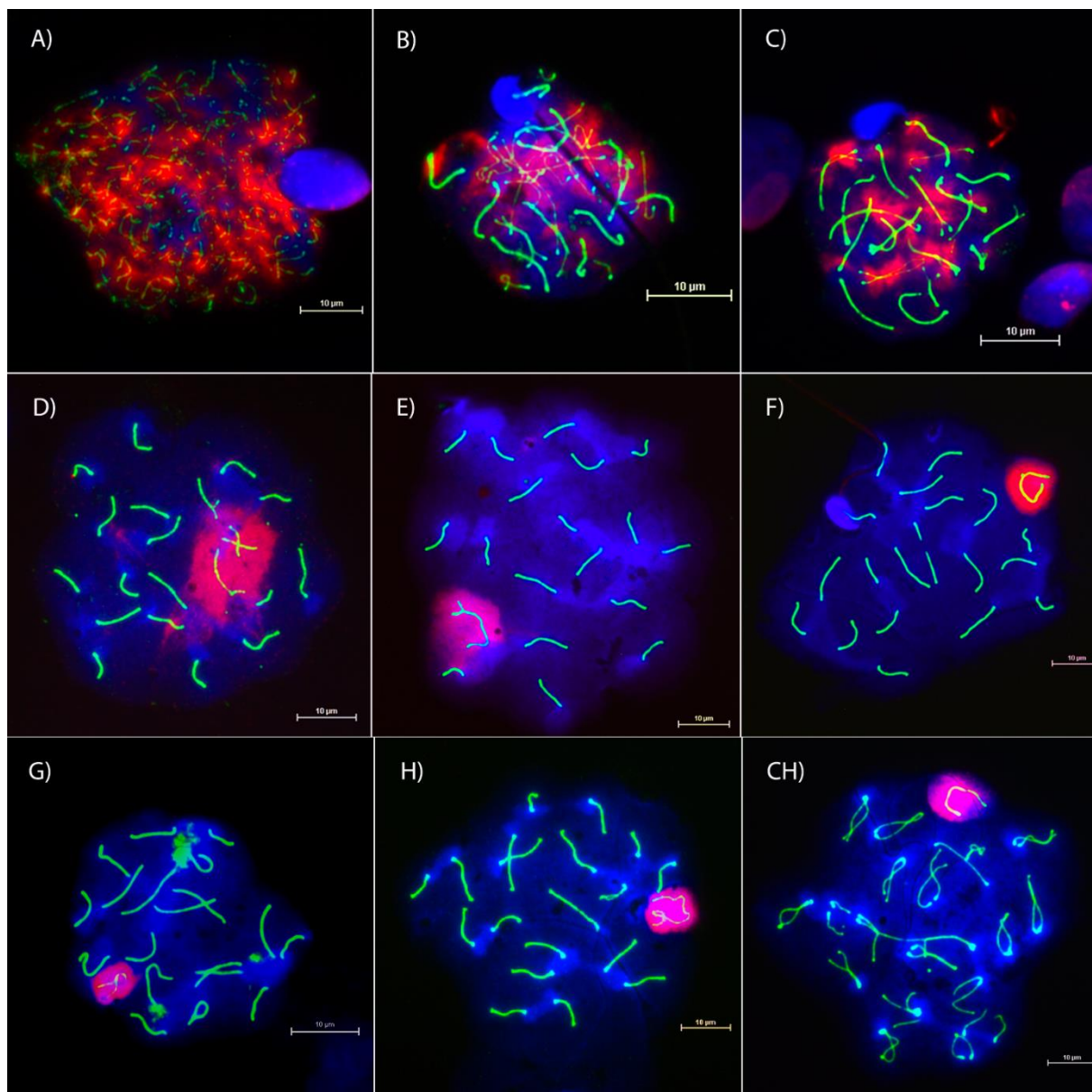
<i>název protilátky a fluorochromu</i>	<i>katalogové číslo</i>	<i>výrobce</i>	<i>ředění</i>
<b>kozí sekun. protilátka proti myší primár. protilátce, Alexa568</b>	A11031	Molecular probes ®	1:400
<b>kozí sekun. protilátka proti králičí primár. protilátce, Alexa 647</b>	A21245	Molecular probes ®	1:400
<b>kozí sekun. protilátka proti morčecí primár. protilátce, FITC</b>	F6261	Sigma- Aldrich	1:400
<b>kozí sekun. protilátka proti králičí primár. protilátce, Alexa 568</b>	A11036	Molecular probes ®	1:400
<b>kozí sekun. protilátka proti myší primár. protilátce, Alexa 488</b>	A11029	Molecular probes ®	1:400
<b>kozí sekun. protilátka proti lidské primár. protilátce, Alexa 647</b>	A21445	Molecular probes ®	1:400

Jednotlivé proteiny, které byly použity jako markery profáze meiózy I jsou vyobrazeny na obrázku 12.



Obrázek 12.: **Profáze meiózy I:** V leptotene jsou formovány dvouvláknové zlomy za pomoci SPO11. Na homologních chromozomech se lokalizuje SYCP3 (červené čárky), který je součástí laterálního elementu. Homology se navzájem hledají, aby mohlo dojít k opravě dvouvláknových zlomů. Na chromozomech jsou lokalizovány reparační proteiny – RAD51 (žluté kolečko) a DMC1 (šedé kolečko). V zygotene se mezi laterální elementy začnou lokalizovat proteiny centrálního elementu (SYCP1) (zelené čárky) a dochází k invazi jednovláknových konců a poté v důsledku syntézy DNA vznikají rekombinační intermediáty. V pachytene je centrální element kompletně dotvořen a homologní chromozomy jsou synapsované podél celé jejich délky. Rekombinační intermediáty jsou opraveny buď CO – tzv. MLH1 a MLH3 závislou cestou (modré kolečko a bílé kolečko), anebo NCO. Růžová a fialová kolečka značí pomocné proteiny vázající rekombinační faktory MLH1 a MLH3. V diplotene se synaptonemální komplex centrálního elementu začne rozvolňovat a homology od sebe disociují. Homologní chromozomy zůstávají spolu asociovány jen v místech CO, v tzv. chiasmatech. Převzato z COHENA a HOLLOWAY *et al.* (2010).

*Způsob odečítání:* Z každého preparátu pro kombinaci protilátek proti: SYCP3,  $\gamma$ -H2AX a H1t bylo vyfoceno za pomoci programu NIS elements BR 4.13.04 64 – bit minimálně 50 jader. Ty následně byly v programu NIS elements BR analysis rozřazeny do vybraných stádií profáze I, kde nejčastěji pozorujeme abnormality: *zygotene*, *zygotene-pachytene*, *pachytene* a *diplotene* viz obrázek 13.



Obrázek 13.: **Vybraná stádia profáze meiózy I.** Zelená barva značí protilátku proti **SYCP3**, červená barva značí protilátku proti **γ-H2AX**, chromatin je obarven **DAPI**. A) zygotene, B) zygotene, C) pozdní zygotene, D) zygotene-pachytene, E) rané pachytene, F) střední pachytene, G) střední pachytene, H) pozdní pachytene, CH) diplotene.

U preparátů s kombinací protilátek proti: MLH1, SCP1, Centromerickým proteinům (CEN) bylo vyfoceno minimálně 30 pachytenních jader. U nich bylo následně v programu NIS elements BR analysis spočteno počet rekombinačních nodulů. Pro dokumentaci profáze meiózy I u preparátů s kombinací protilátek proti: HORMAD2, SCP3 a centromerickým proteinům (CEN) bylo vyfoceno cca 10 jader.

#### 4.2.3.4 Histologické řezy testes

Jedno *testis* bylo umístěno po pitvě do fixačního roztoku - Bouine a zde bylo ponecháno při 4 °C přes noc (cca 16 hodin). *Testis* bylo 5x promyto 1x konc. PBS a 30 minut bylo inkubováno v 50% (v/v) ethanolu. *Testes* byla uskladněna v 70% (v/v) ethanolu ve 4 °C. Maximální doba uskladnění nepřesáhla 14 dní. *Testes* byla umístěna do automatizovaného tkáňového přístroje ASP200S (Leica). Ten zajistil, že tkáň byla dostatečně dehydratována a prosycena voskem. *Testes* po automatizovaném promytí byla zalita do parafrinového bločku (parafrinová zalévací linka EG1150H, Leica). Po ztuhnutí byl parafrinový bloček uskladněn ve 4 °C. Na mikrotomu (RM2255, Leica) byl bloček nařezán na 3 µm tlusté řezy, které byly přeneseny na podložní sklo (cca 20 řezu/sklo). Řezy se nechaly zaschnout do druhého dne (12 hodin) a poté byly obarveny pomocí hematoxylin-eosinu (viz tabulka 6.) Barvení spočívalo v postupné zavodňovací sestupné alkoholové řadě (hematoxylin a eosin Y jsou vodné roztoky) a poté opětovné odvodňovací vzestupné alkoholové řadě.

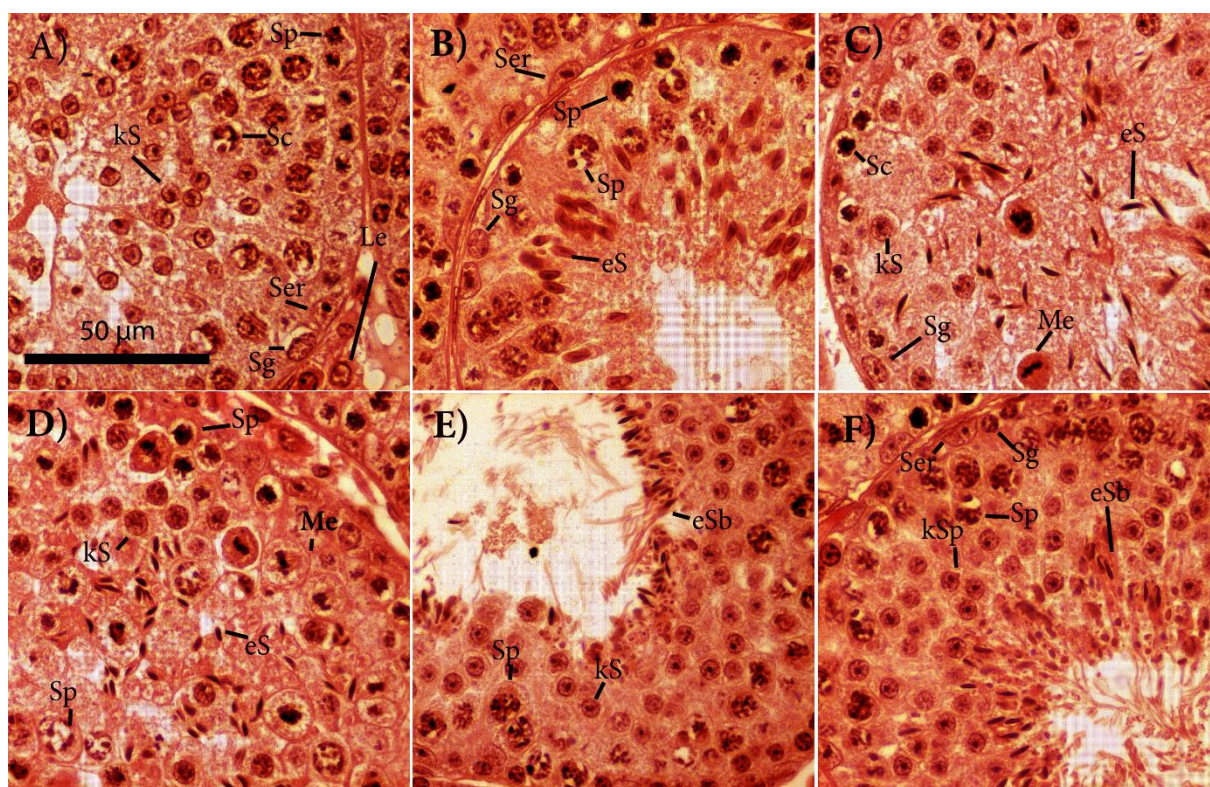
Tabulka 6.: Časový rozpis barvení řezů *testes* pomocí hematoxylin-eosin

Doba inkubace[min]	Chemikálie
5	Xylen
4-5	Xylen
4-5	Xylen
5	Xylen : 100% ethanol (1 : 1)
4	100% ethanol
4	100% ethanol
4	95% (v/v) ethanol
4	70% (v/v) ethanol
2	Destilovaná H <sub>2</sub> O
1	Vodný roztok hematoxylin (Sigma) a promytí dH <sub>2</sub> O
4	Vodný roztok 1% (w/v) eosinu Y
1	Destilovaná H <sub>2</sub> O
4	70% ethanol
4	95% ethanol
4	100% ethanol
4	100% ethanol
5	Xylen : 100% ethanol (1 : 1)
4-5	Xylen
4-5	Xylen

*Způsob odečítání:* Pomocí průhledného tvrdnouceho média Solakrylu byly vytvořeny trvalé preparáty, které byly následně odečítány pod světelným mikroskopem (Eclipse E200, Nikon). V jednom řezu bylo vyfoceno cca 30-50 kanálků, které byly rozřazeny do několika



kategorií: *kanálky obsahující dva typy spermatid, kanálky obsahujících jeden typ spermatid, kanálky obsahující elongované spermatidy s bičkem* (viz obrázek 14.). Následně byly identifikované patologické kanálky: *kanálky obsahující „pseudovakuolu“ - potrhání lumen v důsledku apoptózy, kanálky obsahující apoptotické buňky*. U patologických kanálků, kde byla pozastavena spermatogeneze, bylo určeno místo zástavy (posledním pozorovaným stádiem byly buď spermatogonie, nebo spermatocyty) (viz obrázek 18. v kapitole 5.1.4.3 Histologie testes delečních linií B6N.Fmr1nb<sup>mut</sup>).



Obrázek 14.: **Kategorie histologických řezů testis.** Řezy byly nabarveny pomocí barvení eozin-hematoxylin. A) kanálek s jedním typem spermatid (kulaté), B) kanálek s jedním typem spermatid (elongované), C) a D) kanálek se dvěma typy spermatid (elongované a kulaté), E) a F) kanálek obsahující dva typy spermatid (elongované s bičkem a kulaté). Sg – Spermatogonie, Sc – spermatocyty, kS – kulaté spermatidy, eS – elongované spermatidy, eSb – elongované spermatidy s bičkem, Me - metafáze, Ser – Sertoliho buňky, Le – Leydigovy buňky.

#### 4.2.4 Detekce apoptotických buněk pomocí kitu DeadEnd™ Fluorometric Tunel systém

##### 4.2.4.1 Odstranění parafinu (tzv. deparafinace) a příprava parafinových řezů pro detekci apoptózy

Řezy, které byly získané metodou popsanou v kapitole 4.2.3.4 Histologické řezy *testes*, byly dále zpracovány dle tabulky 7.

Tabulka 7.: Časový rozpis deparafinace a přípravy parafinových řezů k detekci apoptózy

Doba inkubace[min]	Chemikálie
5	xylén
5	xylén
5	xylén:100% : ethanol (1 : 1)
3-4	100% ethanol
3-4	100% ethanol
3-4	95% (v/v) ethanol
3-4	70% (v/v) ethanol
5	0,85% NaCl
5	1x konc. PBS

##### 4.2.4.2 Detekce apoptózy

Po 5 minutové inkubaci v 1x konc. PBS (viz tabulka 7.), byla podložní skla fixována 4% (w/v) PFA (15 minut). Podložní skla byla následně omyta 1x konc. PBS a bylo na ně nanášeno 100 µl roztoku proteinázy K (20 µg/ml) a přiložena krycí skla. Inkubace probíhala při pokojové teplotě 8-10 minut ve vlhké komůrce (nádobka od 1 000 µl špiček s dH<sub>2</sub>O). Z podložních skl se nechala gravitací sklouznout krycí skla a následně byla podložní skla inkubována v 1x konc. PBS po dobu 5 minut. Preparáty byly opětovně fixovány v 4% (w/v) PFA, tentokrát ale po dobu 5 minut. Poté bylo na podložní skla nanášeno 100 µl „Equilibration Buffer“ a znovu přiložena krycí skla. Inkubace probíhala při pokojové teplotě po dobu 5-10 minut ve vlhké komůrce (nádobka od 1 000 µl špiček s dH<sub>2</sub>O). Po inkubaci se nechala gravitací sklouznout krycí skla a na podložní skla bylo nanášeno 100 µl „Reakčního mixu“ obsahující TdT (terminální deoxynukleotidyl transferázu) a byla přiložena krycí skla. Inkubace probíhala opět ve vlhké komůrce při 37 °C. Reakce byla zastavena odstraněním krycích skl a oplachem v 2x konc. roztoku SSC po dobu 15 minut při pokojové teplotě za tmy. Podložní skla byla inkubována 5 minut v 1x konc. PBS a oplach byl opakován ještě 2x (opět po dobu 5 minut). Inkubace probíhala ve tmě. Pro vizualizaci chromatinu bylo použito 25 µl montovacího média (Vectashield MM with DAPI H-1200). Preparáty byly skladovány při 4 °C a pozorovány pod imunofluorescenčním mikroskopem (Eclipse E400, Nikon).

*Způsob odečítání:* Z každého preparátu bylo v jednom histologickém řezu vyfoceno a vyhodnoceno 100 kanálků. U kanálků byla určena přítomnost apoptotických buněk a počet těchto buněk na kanálek.

#### **4.2.5 Použité výpočetní a statistické metody pro interpretaci fenotypu:**

1. Váhová hodnota: *testes* a těla
2. Počet spermií
3. Poměrné zastoupení morfologicky abnormálních spermií
4. Poměrné zastoupení extrémně morfologicky abnormálních spermií
5. Poměrné zastoupení abnormálních pozdních a středních pachytenních jader (hltně pozitivních)
6. Poměrné zastoupení abnormálních diplotenních jader
7. Poměrné zastoupení kanálků obsahující dva typy spermatid – elongované a kulaté
8. Poměrné zastoupení kanálků obsahující jeden typ spermatid
9. Poměrné zastoupení kanálků obsahující dva typy spermatid – elongované a kulaté, přičemž elongované mají bičík
10. Poměrné zastoupení kanálků obsahující „pseudovakuolu“ (viz obrázek 18.)
11. Poměrné zastoupení kanálků obsahujících apoptotické buňky
12. Poměrné zastoupení patologických kanálků (vykazující zástavu spermatogeneze)

Data jednotlivých fenotypů byla zpracována v programu MS Excel a tříděna do kategorií: podle věku samců a podle typu mutace (vznik potenciálního alternativního start kodonu ATG).

Data z bodu 1-4 byla zpracována pomocí krabicových grafů (boxplot) v programu R verze 2.9.1. Pro posouzení statistické významnosti pozorovaných rozdílů mezi delečními mutantami a kontrolami (B6N) byla použita „p-hodnota“ („p-value“), která nám stanovuje pravděpodobnost, s jakou bychom pozorovali naměřená data nebo data ještě extrémnější, v případě, že by mezi porovnávanými skupinami nebyl žádný rozdíl (tzv. nulová hypotéza). Pokud tato hodnota vyjde malá ( $\leq 5\%$ ), pak zamítneme tzv. nulovou hypotézu (mezi porovnávanými skupinami není rozdíl) a přikloníme se k tzv. alternativní hypotéze, tudíž na základě naměřených dat porovnávané skupiny vykazují rozdíl.

Data z bodu 5-12 byla zpracována pomocí základních statistických funkcí (průměr a směrodatná odchylka) a vynesena do grafu pomocí programu MS Excel.



#### 4.2.6 Odběr tkáně pro izolaci DNA

Pro izolaci DNA byl použit následující materiál:

1. Ocásek – cca 0,5 cm: odebrán ošetřovatelem na základě požadavku v PyRATu. Ocásky byly po zajištění uchovány v -20 °C v centrifugační mikrozkuhavce.
2. Slezina – zajištěna při pitvě jedince a skladovaná v -80 °C

#### 4.2.7 Extrakce vysokomolekulární DNA pomocí Gentra® Puregene® Core Kit A od firmy Qiagen

Z myšího ocásku bylo odstřiženo cca 2 mm tkáně a ty byly pinzetou přeneseny do 300 µl roztoku - „Cell lysis solution“. Ze sleziny bylo odebráno 2-3 mg tkáně a poté též přeneseny do 300 µl roztoku - „Cell lysis solution“. Dále bylo se vzorkem zacházeno stejně jako v případě myšího ocásku. Tkáň byla pomocí pitevních nůžek rozstříhána na drobné kousky. Ke vzorku bylo přidáno 1,5 µl proteinázy K o koncentraci 20 mg/ml. Vzorek byl 25x převrácen a umístěn na mini-rotátor RS-24 (Biosan). Tkáň se na mini-rotátoru inkubovala přes noc (cca 16 hodin) při 55 °C v termostatu EN 500 (Trigon-plus). Druhý den byl vzorek stočen na maximální možné otáčky (16 100 rcf) 1 min při pokojové teplotě na mikrocentrifuze (Eppendorf 5415D). Supernatant byl odebrán do nových 1,5 ml centrifugačních mikrozkuhovek a bylo k němu přidáno 1,5 µl RNázy A. Vzorek byl 25x převrácen a následně byl za mírného třepání inkubován v termomixéru Comfort (Eppendorf) 1 hodinu při 37 °C. Vzorek se po hodině ihned přenesl na led na dobu 5 minut. Ke vzorku bylo přidáno 100 µl roztoku - „Protein precipitation solution“, který sloužil k vysrážení proteinů. Vzorek byl protřepán na vortexu (REAX Top, Heidolph) 20 sekund a následně centrifugován 3 minuty na maximální otáčky (16 100 rcf, pokojová teplota). Supernatant byl přenesen do nových centrifugačních mikrozkuhovek a ke vzorku bylo přidáno 300 µl isopropanolu. Vzorek byl opatrně 50x převrácen. DNA se vysrážela do podoby bílých, tenkých vláken. Vzorek byl opět 1 minutu centrifugován na maximální otáčky (16 100 rcf, při pokojové teplotě). Supernatant byl odstraněn a DNA peleta byla promyta 300 µl 70% (v/v) ethanolu. Vzorek byl opět centrifugován po dobu 1 minuty na maximální otáčky (16 100 rcf, při pokojové teplotě). Supernatant byl odstraněn a peleta byla při pokojové teplotě sušena cca 5 minut. K peletě bylo přidáno 25 µl roztoku „Hydration solution“, vzorek byl 5 sekund protřepán a poté 1 hodinu inkubován v 65 °C v termomixéru. Vzorek byl centrifugován 30 sekund při pokojové teplotě na maximální otáčky (16 100 rcf). Vzorek byl za účelem úplného rozpuštění DNA inkubován přes noc (16 hodin) v termomixéru za mírného třepání při pokojové teplotě. Vzorky byly skladované při 4 °C.

*Kontrola kvality a koncentrace DNA:* druhý den byla změřena koncentrace a kvalita (poměr A260/A280, A260/A230) DNA na spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop). Vzorek byl pro genotypování naředěn ultračistou vodou na koncentraci 50 ng/μl.

#### 4.2.8 Genotypizace

Genotypizace byla použita pro potvrzení příslušnosti zpracovaných myší k jednotlivým mutačním liniím genu *Fmr1nb*. Celkový objem PCR (polymerázové řetězové reakce) byl 20 μl. Reakční směs obsahovala: ultračistou vodu, PCR pufr s KCl (50 mM), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM každého dNTP, 0,3 U Taq DNA polymerázy, 0,5 μM primerů, 1,2 μl DNA templátu. Amplifikace DNA templátu pomocí PCR proběhla v 8-jamkových mikrozkušavkách („stripech“) v přístroji pro PCR (XP cyclers, BIOER) za podmínek uvedených v tabulce 8. – 10.

Tabulka 8.: **Amplifikační program pro detekce delece: 102 nt, 237 nt.**

\* značí cykly, které se opakují. Počet opakování je 40.

cyklus	teplota [°C] čas [min]
1.	94 °C - 2:00
2. *	94 °C - 0:30
3. *	62 °C - 0:30
4. *	72 °C - 0:30
závěr	72 °C - 5:00

Tabulka 9.: **Amplifikační program pro detekci delece: 367 nt.**

\* značí cykly, které se opakují. Počet opakování je 40.

cyklus	teplota [°C] čas [min]
1.	94 °C - 2:00
2. *	94 °C - 0:30
3. *	62 °C - 0:30
4. *	72 °C - 1:10
závěr	72 °C - 5:00

Tabulka 10.: **Amplifikační program pro detekci delece: 23 nt, 37 nt, 72 nt a substituci dvou AMK.** # s každým kolem amplifikace se sníží teplota nasedání primerů (3. cyklus, 1. kolo) o 1 °C. Po pěti cyklech se teplota nasedání primerů ustálí na 58 °C. V 1. kole \* značí cykly, které se opakují. Počet opakování je 5. V 2. kole \*\* značí cykly, které se opakují. Počet opakování 40.

1. kolo		2. kolo	
cyklus	teplota [°C] čas [min]	cyklus	teplota [°C] čas [min]
1.	94 °C - 2:00	1.	94 °C - 2:00
2. *	94 °C - 0:30	2. **	94 °C - 0:30
3. *	64 °C # - 1°C - 0:20	3. **	58 °C - 0:20
4. *	72 °C - 0:40	4. **	72 °C - 0:40

#### 4.2.9 Elektroforéza

PCR amplikony, které byly získané dle metody v kapitole 4.2.8 Genotypizace, byly rozděleny na horizontální gelové elektroforéze (zdroj napětí RPS 301, AP Czech; elektroforetická vana Model 96 Cell, Bio-Rad). Pro identifikaci jednotlivých delecí byl použit 2,5% (w/v) agarozový gel. Pro delece, kde byl rozdíl oproti standardní alele jen 23 nt nebo 10 nt (delece 16 nt v kombinaci s inzercí 6 nt), byl použit 3% (w/v) agarozový gel. DNA byla zviditelněna pod UV světlem pomocí interkalační fluorescenční barvy Midori Green (Nippon Genetics). Roztok byl přidáván přímo do rozpuštěného gelu před jeho ztuhnutím (2 µl Midori Green na 100 ml gelu). Před nanášením vzorku na gel k němu byla přidána nanášecí barvička Orange G s glycerolem v množství jedné desetiny objemu vzorku. Elektroforetická sestava byla přelita 0,5x konc. TBE pufrem a byla puštěna pod napětím 8,4 V/cm. DNA v gelu byla zviditelněna pod UV světlem a gely vyfoceny pomocí UV transiluminátoru s kamerou (G:Box, Syngene) s dokumentačním systémem GeneSys (Syngene).

#### 4.2.10 Purifikace DNA z gelu pomocí QIAEX II® Gel Extraction Kit

PCR amplikony byly rozděleny podle velikosti v 2,5% (w/v) agarozovém gelu (viz kapitola 4.2.9 Elektroforéza). Pomocí skalpelu byl vyříznut gel s DNA dané velikosti. DNA byla zviditelněna pod UV světlem za použití GeneSnap UV transiluminátoru (Syngene, Synoptics Ltd.). Gel s DNA fragmentem byl umístěn do centrifugační mikrozkušavky a uchován až do zpracování v -20 °C. Na každých 100 mg gelu bylo přidáno 300 µl „Buffer QX1“. Vzorek byl inkubován při 50 °C v termomixéru Comfort (Eppendorf) a to do úplného rozpuštění agarózy (cca 15 minut). „QIAEX II“ byl resuspendoval na vortexu (REAX Top, Heidolph, 30 sekund). Ke  $\leq 2$  µg DNA bylo přidáno 10 µl „QIAEX II“. Vzorek se důkladně protřepal a nechal se 10 minut inkubovat na termomixéru při 50 °C, přičemž každé 2 minuty byl vzorek překlopen. Tento krok sloužil k absorpci DNA fragmentů na „QIAEX II“ partikule. Zcela

zásadní pro tento krok bylo pH, protože absorpce probíhala pouze při  $\text{pH} \leq 7.5$ . K identifikaci pH sloužil pH indikátor, jenž byl součástí „QX1 Buffer“. Pokud roztok změnil barvu ze žluté na fialovou, pak bylo pH vyšší než optimum a bylo nutné přidat 10  $\mu\text{l}$  3 M octanu sodného. Vzorek byl centrifugován na maximální otáčky 30 sekund při pokojové teplotě (16 100 rcf, mikrocentrifuga, Eppendorf 5415D). Supernatant byl odstraněn a peleta promyta 500  $\mu\text{l}$  „Buffer QX1“. Vzorek byl opětovně centrifugován na maximální otáčky (16 100 rcf) 30 sekund při pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta 500  $\mu\text{l}$  „Buffer PE“. Vzorek byl znovu centrifugován na maximální otáčky (16 100 rcf) 30 sekund při pokojové teplotě. Supernatant byl odebrán a peleta promyta ještě jednou 500  $\mu\text{l}$  „Buffer PE“. Po opětovné centrifugaci (16 100 rcf, 30 sekund, při pokojové teplotě) byl naposledy důkladně odebrán supernatant a peleta sušena 12 minut. Vzorek byl resuspendován při pokojové teplotě s 20  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Poté byl vzorek centrifugován (30 sekund, 16 100 rcf, při pokojové teplotě). Supernatant byl přenesen do nových centrifugačních mikrozkupek.

*Kontrola kvality:* Koncentrace a kvalita (poměr A260/A280, A260/A230) DNA byla změřena na spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop).

#### 4.2.11 Sekvence za použití BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Sekvenování bylo založeno na použití Sangerovy dideoxy terminační metody pomocí automatizovaného genetického analyzátoru (ABI PRISM 313xl) vědecko-servisním pracovištěm Mikrobiologického ústavu Akademie věd. Sekvenační reakce probíhala v celkovém objemu 10  $\mu\text{l}$  a obsahovala 0,5x „Terminator ready rection Mix“, 0,32  $\mu\text{M}$  primer, 0,5x „BigDye“ Sekvenační pufer a 2  $\mu\text{l}$  templátové DNA - PCR produktu (5-15 ng/2 $\mu\text{l}$ ). Množství templátové DNA, které je nutné přidat na sekvenační reakci v závislosti na její délce je shrnut v tabulce 11. Sekvenační reakce probíhala na přístroji pro PCR (XP cycycler, BIOER) v mikrozkupece za podmínek uvedených v tabulce 12.

Tabulka 11.: Množství templátové DNA (PCR produktu) na sekvenační reakci v závislosti na délce

Délka templátu – PCR produktu [bp]	Množství DNA na reakci
100- 200 bp	1- 3 ng
200- 500 bp	3- 10 ng
500- 1000 bp	5- 20 ng
1000- 2000 bp	10- 40 ng
> 2000 bp	40- 100 ng

Tabulka 12.: **Amplifikační program pro sekvenační reakci.**

\* značí cykly, které se opakují. Počet opakování 25.

cyklus	teplota [°C] čas [min]
1.	96 °C - 1:00
2. *	96 °C - 0:10
3. *	50 °C - 0:05
4. *	60 °C - 4:00
závěr	60 °C - 0:11

Po amplifikaci následovala purifikace produktu sekvenační reakce. Do 1,5 ml centrifugačních mikrozkušavek byl přidán 1 µl 125 mM EDTA (pH 8), 1 µl 3 M octanu sodného (pH 5,2) a 10 µl produktu sekvenační reakce. Vzorek byl promíchán a bylo k němu přidáno 25 µl 100% ethanolu. Vzorek byl centrifugován (16 100 rcf, 27 minut, při pokojové teplotě) na mikrocentrifuze (Eppendorf 5415D). Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta 70% (v/v) ethanolem. Vzorek se opětovně centrifugoval na maximální otáčky (16 100 rcf, 10 minut, při pokojové teplotě). Supernatant byl odstraněn a peleta byla sušena v termomixéru Comfort (Eppendorf) při 70 °C po dobu 2 minut. Získané sekvence byly analyzovány pomocí programu (SeqMan Pro).

#### 4.2.12 Izolace celkové RNA pomocí High Pure RNA Tissue Kit

Na izolaci RNA z *testis* bylo použito 10 – 20 mg tkáně. K vzorku bylo přidáno 400 µl „Lysis binding buffer“. Homogenizace tkáně byla provedena na „Tissuelyser II“ (Retsch) za pomoci kovových partikulí firmy QIAGEN. Homogenizace byla provedena 2x a to pokaždé po 2 minutách (rychlost: 10 kmt/s). Lyzát byl centrifugován (na 13 000 rcf, 2 minuty, při pokojové teplotě). K lyzátu bylo přidáno 200 µl 100% ethanolu a následně byl obsah zkumavky promíchán. Lyzát byl nanesen na kolonku, jež byla součástí kitu (High Pure RNA Tissue Kit). Obsah rezervoáru byl vylit. Na kolonku bylo nanесeno 100 µl roztoku (90 µl inkubačního pufru pro DNásu I a 10 µl DNásy I) a celý obsah kolonky byl s roztokem inkubován 15 minut při pokojové teplotě. Na kolonku bylo následně přidáno 500 µl „Wash Buffer I“. Vzorek byl centrifugován 8 000 rcf 15 sekund při pokojové teplotě (centrifuga MII2022R, Hettich) a obsah rezervoáru byl vylit. Na kolonku bylo nanесeno 500 µl „Wash Bufffer II“ a vzorek byl centrifugován při 8 000 rcf 15 sekund. Obsah rezervoáru byl vylit a na kolonku bylo tentokrát nanесeno 300 µl „Wash Buffer II“. Vzorek byl opětovně centrifugován 2 minuty při 13 000 rcf při pokojové teplotě. Eluce probíhala do nových centrifugačních mikrozkušavek pomocí 100 µl „Elution Buffer“. RNA byla uchována při -80 °C

*Kontrola kvality:* Koncentrace a kvalita (poměr A260/A280, A260/A230) RNA byla změřena na spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop).

#### **4.2.13 Izolace celkové RNA pomocí Trizol Reagents**

Na izolaci celkové RNA z *testis* bylo použito 60 – 100 mg tkáně. Tkáň byla umístěna do 1 ml „TRIZOL Reagents“ a po 5 sekundách byla provedena homogenizace na Ultra-torrax T25 (IKA) (rychlost: 5, 60 sekund). Po homogenizaci byl vzorek inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Celý objem byl přenesen do centrifugační mikrozskumavky s 200 µl chloroformu. Vzorek byl důkladně protřepán (vortex - REAX Top, Heidolph) po dobu 15 sekund. Poté se nechal vzorek inkubovat při pokojové teplotě 2-5 minut a před vložením do centrifugy byl ještě jednou převrácen. Centrifugace probíhala při 12 000 rcf, 15 minut při 4 °C (centrifuga MII2022R, Hettich). Po centrifugaci byla přenesena vodná fáze (cca 360 µl). RNA byla vysrážena 400 µl isopropanolu. Vzorek se nechal inkubovat 10 minut při pokojové teplotě a následně byl centrifugován 12 000 rcf 10 minut při 4 °C (centrifuga MII2022R, Hettich). Supernatant byl odebrán a peleta byla promyta 600 µl 75% (v/v) ethanolu. Vzorek byl protřepán 5 sekund na vortexu a centrifugován (7 500 rcf, 5 minut, 4 °C). Supernatant byl odebrán a peleta opětovně promyta 300 µl 75% (v/v) ethanolu. Vzorek byl centrifugován 7 500 rcf 5 minut při 4°C. Supernatant byl odebrán a peleta byla převrstvena 200 µl 75% (v/v) ethanolu a až do zpracování byl vzorek uchován při -80 °C. Pro jednotnost zpracování byl vzorek přečištěn pomocí High Pure RNA Tissue Kit. Vzorek byl centrifugován 7 500 rcf 10 min při 4 °C (centrifuga MII2022R, Hettich). Peleta byla sušena 12 minut při pokojové teplotě. Ke vzorku bylo přidáno 20 µl DEPC (Diethylpyrokarbonátová) H<sub>2</sub>O. Vzorek byl protřepán a inkubován při 60 °C po dobu 20 minut. Po inkubaci byl protřepán po dobu 5 sekund na vortexu (REAX Top, Heidolph). Poté byl vzorek inkubován 30 minut v lednici. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl 100% ethanolu a dále bylo se vzorkem zacházeno podle postupu v kapitole 4.2.12 Izolace celkové RNA pomocí High Pure RNA Tissue Kit.

Důvodem, proč vzorky musely být přečištěné, bylo poškození homogenizačních nástavců pro Ultra-torrax T25 a navíc získání vzorků, které budou jednotně připraveny a ošetřeny DNázou I.

*Kontrola kvality:* Koncentrace a kvalita (poměr A260/A280, A260/A230) RNA byla změřena na spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop).

#### 4.2.14 Reverzní transkripce spojená s PCR (RT-PCR)

Reverzní transkripce byla využita pro stanovení exprese studovaného genu (v tomto případě genu *Fmr1nb*). Tato metoda byla založena na PCR, jako templát posloužil první řetězec cDNA (komplementární řetězec k mRNA). Reakce probíhala v celkovém objemu 20 µl a obsahovala: 0,05 µg/µl, 0,5 mM od každého dNTP, 10 ng/µl náhodných hexamérů, 1x „First Strand Buffer“, 10 µM DTT, 2 U/1 µl RNAsin a 10 U/1 µl M-MLV-reverzní transkriptázy. Nejdříve byly smíchány náhodné hexaméry se směsí dNTP. Směs byla přenesena do mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 10 µl RNA. Obsah mikrozkušavky byl protřepán. Denaturace sekundárních struktur RNA probíhala v PCR přístroji (XP cycler, BIOER) při 70 °C po dobu 5 minut, poté byly vzorky rychle přeneseny na led a zde byly ponechány 5 minut. Ke vzorku byla přidána směs: „First Strand Buffer“, DTT a RNAsinu. Obsah mikrozkušavky byl protřepán. Každý vzorek byl rozdělen na dvě části. K první části (RT+) byla přidána M-MLV- reverzní transkriptáza, která sloužila k syntéze cDNA. K druhé části (RT-) nebyla M-MLV-reverzní transkriptáza přidána a sloužila tak k odhalení DNA kontaminace. Přepis (jak RT+, tak i RT-) do cDNA probíhal na PCR přístroji (XP cycler, BIOER) za podmínek uvedených v tabulce 13.

Tabulka 13.: Program pro reverzní transkripci.

cyklus	teplota [°C] čas [min]
1.	25 °C - 10:00
2.	37 °C - 50:00
3.	42 °C - 5:00
4.	55 °C - 5:00
inaktivace	70 °C - 15:00

Ke vzorkům bylo přidáno 80 µl 5 mM Tris-HCl (pH 7,5) a obsah mikrozkušavky byl protřepán. Vzorky byly skladovány při -80 °C.

#### 4.2.15 Kvantitativní RT-PCR analýza v reálném čase (real-time RT-PCR)

Výhodou této metody je možnost detekce množství produktů po každém kolu amplifikace. Pro detekci amplikonů bylo použité fluorescenční barvivo SYBR green, jež se váže zcela nespecificky do malého žlábků DNA. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 4. (*Fmr1nb*\_UPL#25\_F a R *Actb*\_UPL#64\_F a R). Data byla analyzována pomocí LightCycler softwaru v3.5.3 (Roche). Úroveň exprese genu *Fmr1nb* byla stanovena relativně vzhledem ke konstitutivně exprimovanému genu  $\beta$ -*Aktin*. Reakce probíhala v objemu 10 µl. Reakční směs obsahovala 2 µl vzorku (RT+ nebo RT-), „1 x Light cycler mix“ (LC fast start

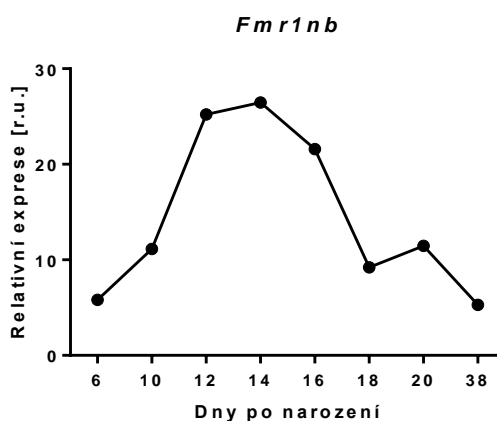
enzyme + reaction mix SYBR green), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM primery, H<sub>2</sub>O (PCR clean). Nejdříve byla v 1,5 ml centrifugační mikrozkušavce smíchána H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, „Light cycler mix“ a primery. Do jednotlivých centrifugačních mikrozkušavek bylo nanášeno 8 µl směsi a 2 µl vzorku. Obsah zkumavky se promíchal a celý objem se nanášel na kapiláru (Roche). Vzorky v kapiláře se stočily 560 rcf po dobu 1 minuty, při pokojové teplotě. Amplifikace byla provedena v přístroji pro qPCR (Light cycler 2000, Roche) za podmínek: 95 °C 0:10, 60 °C 0:05, 72 °C 0:20. Počet cyklů bylo 45.



## 5 Výsledky

### 5.1 Výběr kandidátního genu

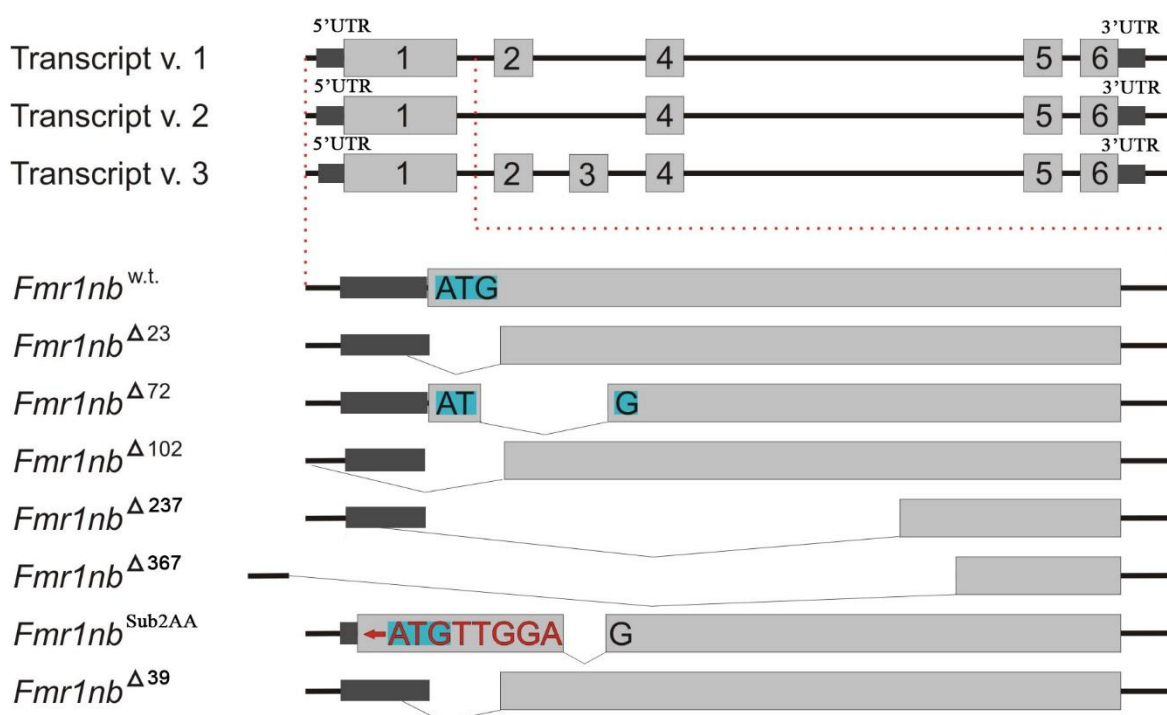
V dříve publikované práci naší laboratoře bylo na základě dvou kritérií určeno sedm kandidátních genů *Hstx1*, *Hstx2* (viz kapitola 2.2.5 Role chromozomu X v hybridní sterilitě). Těmito nezbytnými předpoklady jsou alelický polymorfismus mezi rodičovskými variantami B6 a PWD kandidátního genu v kódující oblasti a exprese kandidátního genu v první meiotické profázi primárních spermatocytů (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Nedávno byly publikovány celogenomové expresní profily testikulární RNA získané z mladých samců starých 6 až 38 dnů, tedy v první postpubertální vlně samčí meiózy (MARGOLIN *et al.* 2014). Testikulární expresní profil genu *Fmr1nb* vykazoval maximum okolo 14-tého dne po narození, tedy v meiotické profázi I, která je z hlediska hybridní sterility klíčová (graf 1.) (MARGOLIN *et al.* 2014).



Graf 1.: **Expresní profil genu *Fmr1nb* v testes juvenilních samců.** Gen vykazoval maximální expresi 14. den po narození, kdy se již objevují pachytenní spermatocyty. Jako zdrojová data pro tvorbu grafu byla použita databáze celogenomových expresních profilů ze studie MARGOLIN *et al.* (2014).

Pro ověření hypotézy, zda má gen *Fmr1nb* vliv na průběh meiózy či spermatogeneze, případně je dalším genem hybridní sterility, byly vytvořeny myši nesoucí delecí genu *Fmr1nb* pomocí TALE-nukleáz. Mutantní myši připravil Dr. Slavo Kinský v laboratoři Prof. Radislava Sedláčka (nepublikovaná data). TALE-nukleázy byly namířeny do prvního exonu genu *Fmr1nb* se záměrem vydeletovat translační start kodon ATG. Touto metodou bylo získáno 23 potomků tzv. „founders“. Pro získání stabilních delečních linií byli původní „founders“ kříženi s inbredním kmenem B6N a jejich potomci byli genotypováni pomocí PCR amplifikace genomové DNA v oblasti předpokládané delecce *Fmr1nb*, případně byl produkt PCR sekvenován. Bylo ustanoveno sedm stabilních delečních linií (viz obrázek 15.). Cílem bylo vytvořit nulové mutanty genu *Fmr1nb*, které nebudou produkovat funkční protein FMR1NB.

Jednotlivé deleční linie nesly nejen nulové mutanty *Fmr1nb*, ale i mutace s potenciálním alternativním start kodonem (viz obrázek 15.). Zcela odlišná pak byla linie B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup> nesoucí deleční mutaci, která zrušila i místo počátku transkripce, a tudíž u ní nebyl vůbec generován transkript genu *Fmr1nb* (viz obrázek 15). Absence transkriptu byla dokumentována metodou RT - qPCR (Graf 5).

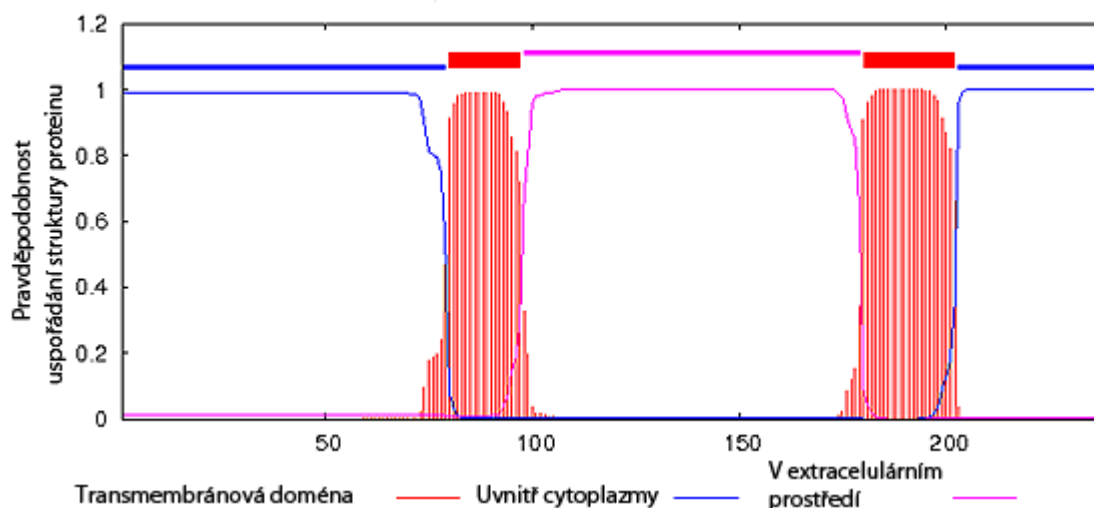


Obrázek 15.: Schéma genu *Fmr1nb* a delečních linií B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> a B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup>. Gen *Fmr1nb* má 3 transkripční varianty. První sestřihová varianta se skládá z exonu 1, 2, 4, 5 a 6 a je dlouhá 799 nt (kódující sekvence 579). Protein kódovaný touto transkripční variantou je dlouhý 192 AMK (aminokyselin). Druhá transkripční varianta se skládá z exonu 1, 4, 5 a 6 (679 nt, přičemž kódující sekvence je dlouhá 501 nt). Protein se skládá ze 166 AMK. Třetí transkripční varianta se skládá z exonu 1 – 6, je dlouhá 842 nt (kódující sekvence je dlouhá 717 nt) a kóduje protein o délce 238 AMK. TALE-nukleázy byly navrženy do exonu 1 v blízkosti ATG start kodonu, který je společný pro všechny transkripční varianty. Bylo ustaveno 7 stabilních delečních linií B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup>. Delece 23 nt, 39 nt, 102 nt, 237 nt, ruší ATG start kodon. Delece 367 ruší transkripční start. Delece 72 nt a delece 16 nt spojená se substitucí 2 AMK vede ke vzniku potenciálního alternativního ATG. (Obrázek vytvořen na základě DNA sekvence myšího genomu <http://www.ensembl.org/> a vlastních dat ze sekvenace jednotlivých delečních mutant viz tabulka 14.).

### 5.1.1 Predikce subcelulární lokalizace proteinu FMR1NB

O funkci genu *Fmr1nb* není doposud mnoho známo. Jeho nejdelší sestřihová varianta se skládá z šesti exonů (viz obrázek 15.). Pomocí programu Predikce proteinových transmembránových helixů (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) bylo zjištěno, že protein FMR1NB obsahuje dvě transmembránové domény (viz graf 2.). Pro analýzu byla použita sekvence

proteinu dlouhého 238 AMK (přístupové číslo proteinu: Q80ZA7.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

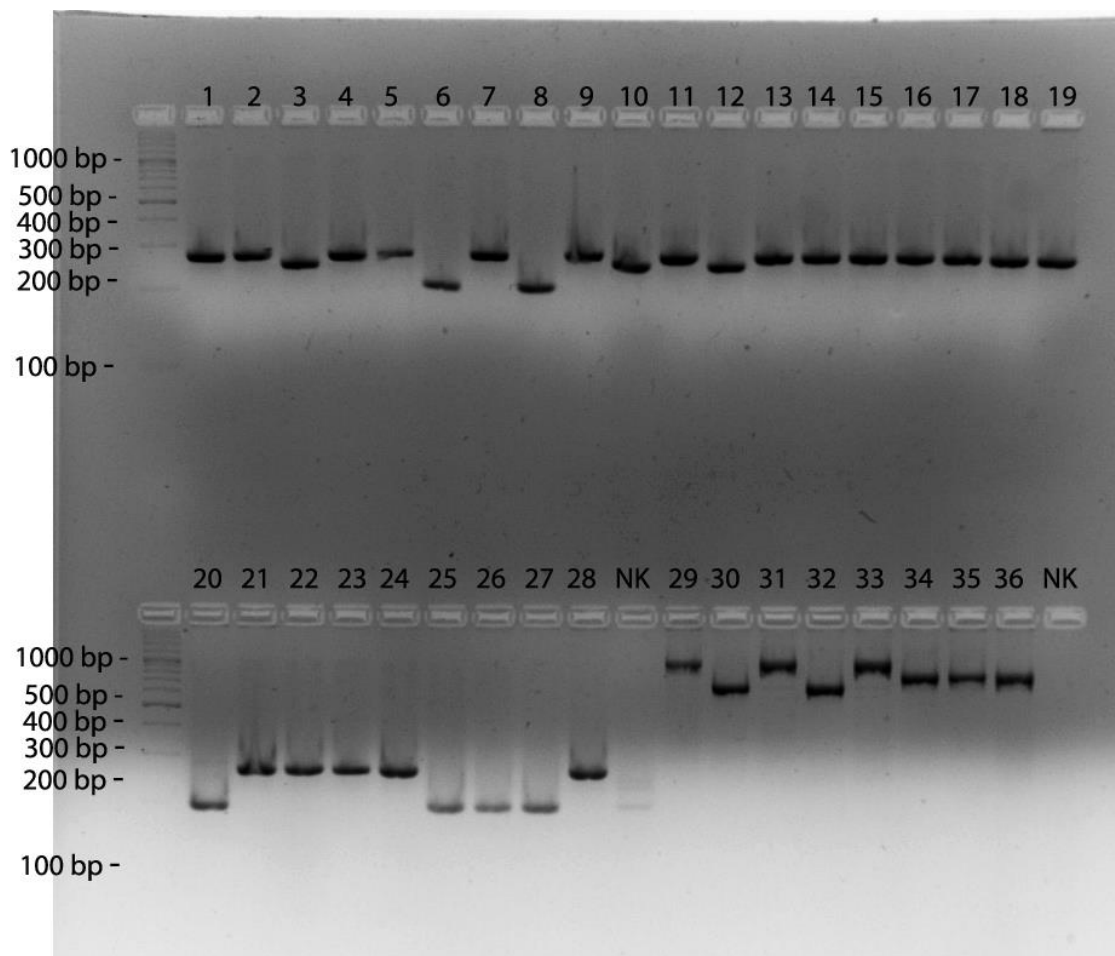


Graf 2. **Predikce transmembránových domén u proteinu FMR1NB (238 AMK).** Osa X značí pořadí aminokyselin (AMK). Hodnota na ose Y značí pravděpodobnost, že doména bude transmembránová či nikoliv. Protein FMR1NB (238 AMK) se skládá z 5 domén, přičemž 2 domény jsou transmembránové. Aminokyselina 1 – 79 – N konec je uvnitř cytoplazmy, kódován exonem 1, AMK 80 – 97 – transmembránová doména, kódována též 1 exonem, AMK 98 – 179 – extracelulární smyčka (kódovaná exonem 1, 2, 3 a 4), AMK 180 – 202 – transmembránová doména (kódovaná exonem 4), AMK 203 – 238 – C konec je uvnitř cytoplazmy (kódován exonem 5 a 6) (vytvořeno s využitím: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; <http://www.ensembl.org/>).

Dále byla pomocí volně dostupného programu (ProtComp v. 9.0/predikce buněčné lokalizace zvířecích a kvasinových proteinů) provedena predikce lokalizace proteinu. (<http://www.softberry.com/>). Program porovnává homologii mezi proteinem FMR1NB a proteiny o známé lokalizaci. Na základě této analýzy vyšlo najevo, že protein je lokalizován na plazmatické membráně (skóre: 10).

### 5.1.2 Genotypování a sekvenace zástupců jednotlivých delečních linií

Pro ověření přítomnosti delece genu *Fmr1nb* byla u všech myší připravena genomová DNA a varianty genotypů *Fmr1nb* byly určeny pomocí specifických primerů navržených do prvního exonu genu *Fmr1nb*. Primery byly namířeny před a za start kodon ATG tak, aby bylo možné odečíst přítomnost delece podle velikosti PCR produktu (obrázek 16. reprezentuje typický výsledek elektroforetické separace a vizualizace PCR produktů na agarozovém gelu).

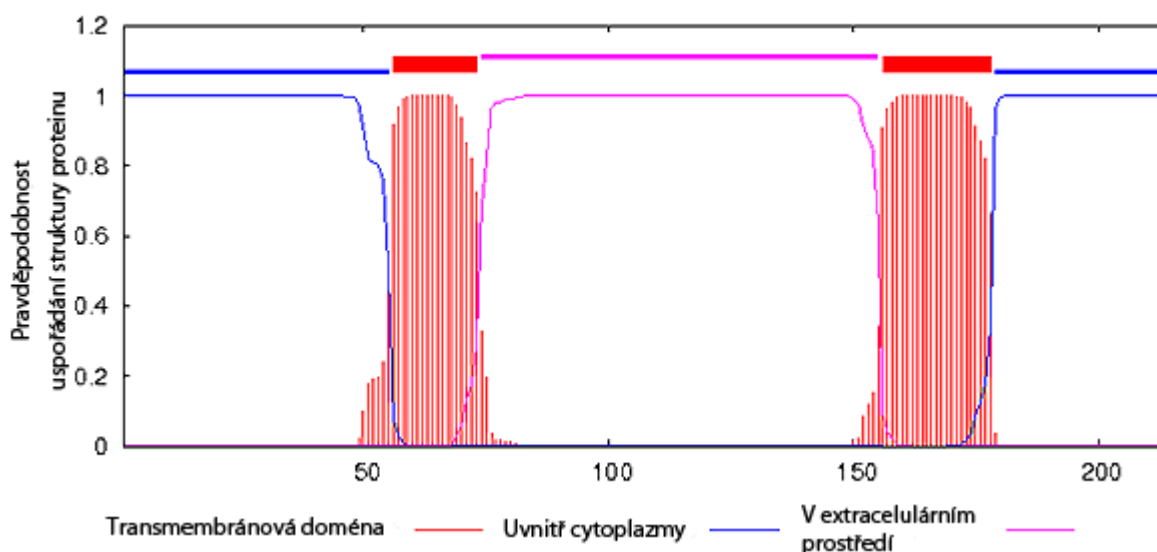


Obrázek 16.: **Produkty PCR reakce rozdělené na 2,5 % agaróovém gelu.** Vzorky 1-28 byly amplifikovány pomocí primerů Fmr1nb\_F2\_22 a Fmr1nb\_R2\_293 (velikost PCR produktu u nemutované myši je 271 bp). Vzorky 29 - 36 byly amplifikovány pomocí primerů Fmr1nb\_D566\_F2 a Fmr1nb\_D566\_R2 (velikost standardního PCR produktu je 900 bp). Vzorky 3, 10, 12 představují nositele delece 23 nt. Vzorek 6, 8, 20, 25, 26, 27 a 28 představují zástupce delece 72 nt. Vzorky 19, 21, 22, 23 a 24 představují zástupce B6N (velikost produktu zde je 271 bp). Vzorky 30 a 32 představují zástupce delece 367 nt. Vzorky 34, 35 a 36 představují zástupce delece 237 nt. NK je negativní kontrola, PCR reakční směs bez DNA.

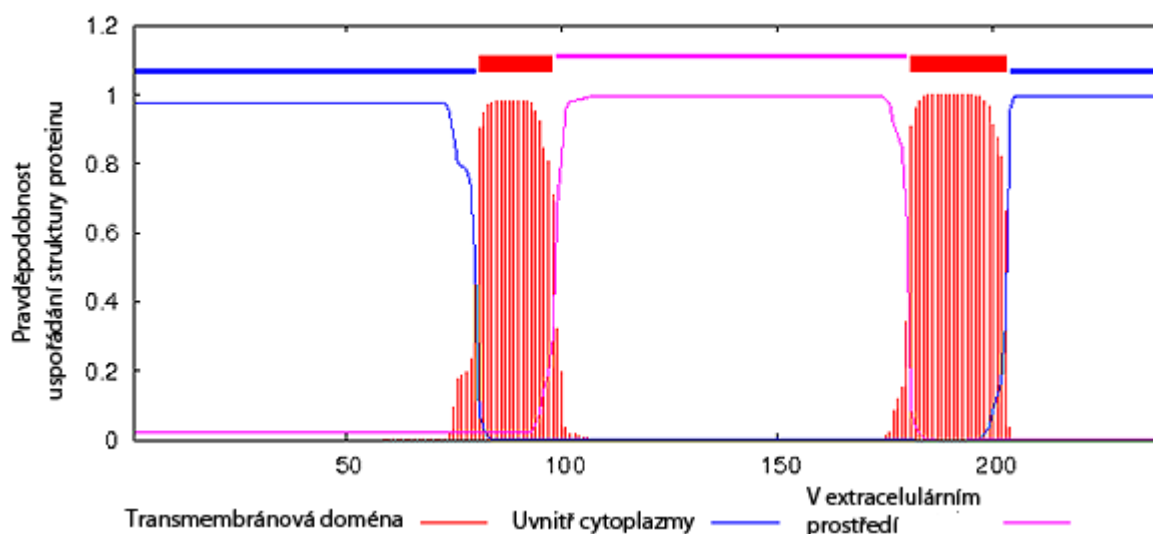
S využitím sekvenačních dat (tabulka 14.) bylo u delecí, které vedly ke vzniku alternativního start kodonu ATG, provedena predikce přítomnosti transmembránových domén pomocí volně dostupného programu: Predikce proteinových transmembránových helixů (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (viz graf 3. a graf 4.).

Tabulka 14.: **Stanovení genomové sekvence delečních mutant genu *Fmr1nb*.** Zástupci delečních linií posloužili jako zdroj genomové DNA pro PCR amplifikaci oblastí přesahujících předpokládané delece *Fmr1nb*. Fragmenty DNA izolované následně po PCR pak byly Sangerovou metodou sekvenovány. Sub. = substituce

Identifikační číslo myši	Předpokládaná mutace	Použité primery pro sekvenaci	Křížení/kmen	Kvalita sekvenační reakce	Potvrzení delece
31001	$\Delta 23$ nt	Fmr1nb_F2_22	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 23</math></sup>	dobrá	$\Delta 23$ nt
28971	$\Delta 16$ nt spojená se sub. 2 AMK	Fmr1nb_F2_22	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup>Sub2AA</sup> x PWD)F1	dobrá	spojená se sub. 2 AMK
28808	$\Delta 37$ nt	Fmr1nb_F2_22	(B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 37</math></sup> x PWD)F1	dobrá	$\Delta 39$ nt
31563	$\Delta 72$ nt	Fmr1nb_F2_22	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 72</math></sup>	dobrá	$\Delta 72$ nt
31462	$\Delta 16$ nt spojená se sub. 2 AMK	Fmr1nb_F2_22	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup>Sub2AA</sup>	dobrá	$\Delta 16$ nt spojená se sub. 2 AMK
31378	$\Delta 102$ nt	Fmr1nb2ouF	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 102</math></sup>	dobrá/nížší signál	$\Delta 102$ nt
28968	$\Delta 72$ nt	Fmr1nb_F2_22	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 72</math></sup>	dobrá	$\Delta 72$ nt
54037	žádná	Fmr1nb_F2_22	B6N	dobrá	divoký typ
34396	$\Delta 72$ nt	Fmr1nb_F2_22	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 72</math></sup>	dobrá	$\Delta 72$ nt
31564	$\Delta 72$ nt	Fmr1nb_F2_22	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 72</math></sup>	dobrá	$\Delta 72$ nt
34134	$\Delta 378$ nt	Fmr1nb_D566_R2	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 378</math></sup>	dobrá	$\Delta 369$ nt
34135	$\Delta 378$ nt	Fmr1nb_D566_R2	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 378</math></sup>	dobrá/nížší signál	$\Delta 367$ nt
34467	$\Delta 236$ nt	Fmr1nb_D566_R2	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 236</math></sup>	dobrá/nížší signál	$\Delta 237$ nt
34468	$\Delta 236$ nt	Fmr1nb_D566_R2	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 236</math></sup>	dobrá	$\Delta 237$ nt
35502	$\Delta 236$ nt	Fmr1nb_D566_R2	B6N. <i>Fmr1nb</i> <sup><math>\Delta 236</math></sup>	dobrá	$\Delta 237$ nt



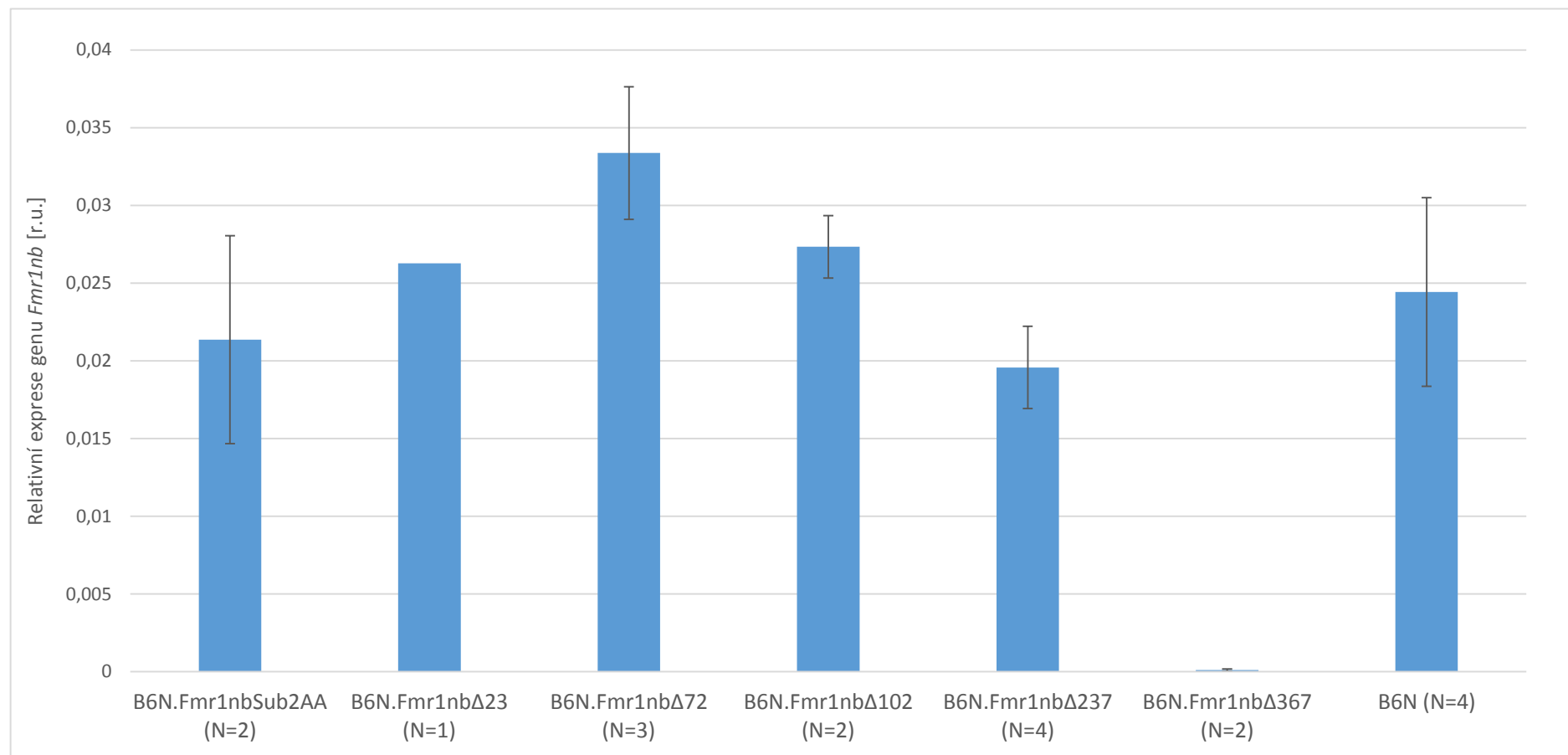
Graf 3.: **Predikce transmembránových domén u deleční linie *Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>.** Delece 72 nt dává možnost vzniku alternativního ATG viz obrázek 15., a tím dojde ke zkrácení proteinu o 23 AMK, protein je dlouhý 214 AMK. Osa X značí pořadí aminokyselin (AMK). Hodnota na ose Y značí pravděpodobnost, že doména bude transmembránová. Doménová struktura se neliší od proteinu FMR1NB (viz předchozí graf 2.) (vytvořeno s využitím: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; <http://www.ensembl.org/>, sekvenačních dat viz tabulka 14.).



Graf 4.: **Predikce transmembránových domén u deleční linie *Fmr1nb*<sup>sub2AA</sup>.** Tento deleční mutant je spojen se substitucí dvou AMK (Leucin, L; glutamová kyselina, E). Protein je po deleci dlouhý 238 AMK. Osa X značí pořadí aminokyselin (AMK). Hodnota na ose Y značí pravděpodobnost, že doména bude transmembránová či nikoliv. Delece 16 nt spojená s inzercí TGTTGGA, vedla ke vzniku potenciálního alternativního ATG viz obrázek 15. a došlo ke zkrácení o dvě AMK, které byly nahrazeny dvěma jinými AMK – L a E. Doménová struktura se neliší od proteinu FMR1NB (viz graf 2.). Vytvořeno s využitím: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; <http://www.ensembl.org/> a sekvenačních dat viz tabulka 14.).

### 5.1.3 Testikulární exprese genu *Fmr1nb* u samců B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup>

Cílem bylo určit vliv delecí genu *Fmr1nb*, na expresi tohoto genu v průběhu spermatogeneze a spermiogeneze u samců B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> a u hybridů s (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1. Úroveň exprese genu *Fmr1nb* byla stanovena relativně vzhledem ke konstitutivně exprimovanému genu *β-Aktin*. Data byla naměřena pomocí metody reverzní transkripce celkové testikulární RNA jednotlivých myší následovaná kvantitativní PCR v reálném čase (RT- real time qPCR). (viz graf 5.). Mutantní linie B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup>, která nesla delecí rušící transkripční start, skutečně neprodukovala mRNA. Jedná se tedy o nulovou mutantu genu *Fmr1nb*. U zbylých mutant vznikala mRNA a relativní exprese genu *Fmr1nb* u zbylých delečních mutant byla srovnatelná s B6N ( $0,024 \pm 0,006$ ). U mutanty B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup> byla relativní exprese genu *Fmr1nb*  $0,2 \pm 0,007$ , u mutanty B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup>  $0,026$ , u mutanty B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>  $0,03 \pm 0,002$ , u mutanty B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ102</sup>  $0,27 \pm 0,002$ . B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup>  $0,0001 \pm 0,006$ .



Graf 5.: **Relativní exprese genu *Fmr1nb* v testis mutantních linií.** Úroveň exprese genu *Fmr1nb* byla stanovena relativně vzhledem konstitutivně exprimovanému genu  $\beta$ -Aktin; podle rovnice:  $Rel. Expr. = 2^{-(CPF-CPA)}$ . CPF (z angl. crosspoint *Fmr1nb*) a CPA (z angl. crosspoint  $\beta$ -Actin). Na ose Y je vynesena relativní exprese genu *Fmr1nb*. Na ose X jsou zástupci delečních linií, počet zpracovaných jedinců (N). Primery byly navrženy do 3'-konce, který je společný všem delečním liniím a jedná se tedy o univerzální primery.



#### 5.1.4 Charakterizace fenotypu u delečních linií genu *Fmr1nb* a kontrol (B6N)

##### 5.1.4.1 Základní parametry fertility u samců delečních linií genu *Fmr1nb*

Samci, nesoucí delece genu *Fmr1nb*, byli genotypováni pomocí PCR anebo DNA sekvenování, později usmrceni a podrobeni pitvě. Byla u nich stanovena váha těla a základní parametry fertility: váha *testes*, relativní váha *testes* (váha *testes* vztažená k váze těla), počet spermií a morfologie spermií. Jako kontrolní skupina byli použiti samci inbredního kmene B6N.

Pomocí statistických testů, Welchova t-testu a Mann-Whitneyova testu, byly porovnávány vždy dvě skupiny myši a to deleční linie B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> vůči inbrednímu kmenu B6N s intaktním genem *Fmr1nb*. Welchův t-test byl použit na data s normálním - Gaussovským rozdělením, které vykazovala například váha *testes* nebo relativní váha *testes*. Naopak Mann-Whitneyovův test byl použit na data, jež toto rozdělení nevykazovala (počet spermií a morfologie spermií).

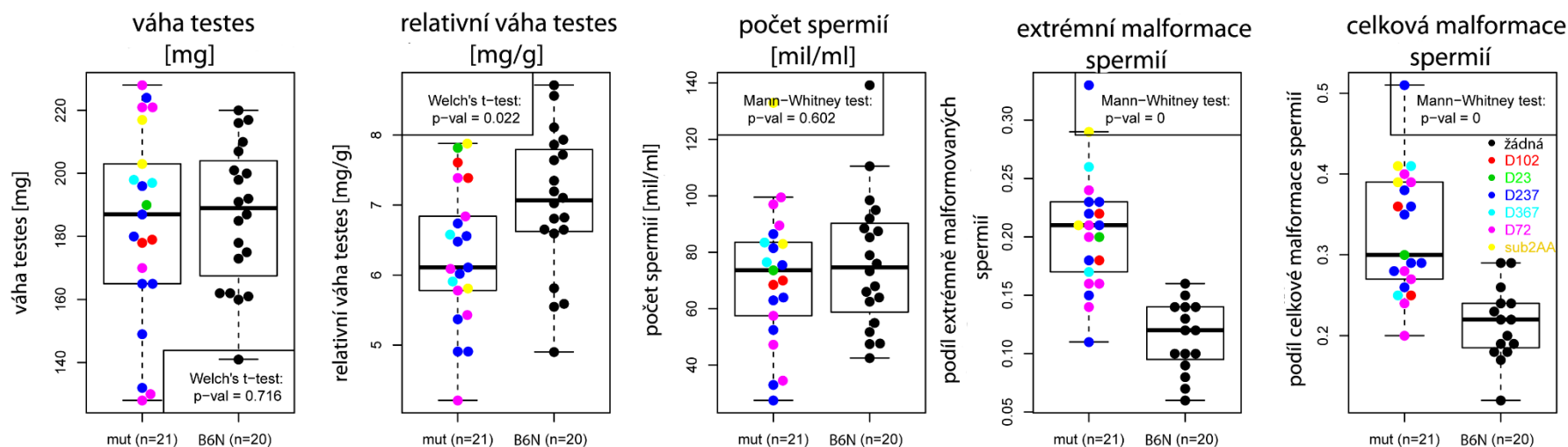
Porovnáním základních parametrů fertility celé skupiny samců delečních linií B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> a kontrolní skupiny B6N (graf 6.) odhalilo statisticky významný rozdíl v relativní váze *testes* ( $P = 0,022$  – stanoveno Welchovým t–testem) a v počtu morfologicky abnormálních spermií ( $P = 0$ , pro kategorii extrémní malformace spermií,  $P = 0$  pro kategorii celková malformace spermií, stanoveno Man-Whitneyovým testem).

Následně byli zástupci delečních linií rozřazeni do několika kategorií. Za prvé podle toho, zda delece genu *Fmr1nb* mohla vést ke vzniku potenciálního alternativního ATG v místě původního (nativního) start kodonu ATG (delece 72 nt,  $\Delta 72$ ; delece 16 nt spojena se substitucí 2 AMK, Sub2AA) či nikoliv (zbylé varianty delecí) (viz graf 7. a 8.). Mediány hodnot počtu extrémně malformovaných spermií a celkově malformovaných spermií se u samců delečních linií B6N.*Fmr1nb* $\Delta 23$ , B6N.*Fmr1nb* $\Delta 102$ , B6N.*Fmr1nb* $\Delta 237$ , (B6N.*Fmr1nb* $\Delta 367$  a kontrolní skupiny B6N lišily signifikantně ( $P = 0$ ,  $P = 0$  – stanoveno Man –Whitneyovým testem; graf 7.). Podobně signifikantní rozdíl byl pozorován mezi mediány hodnot počtu extrémně malformovaných spermií a celkově malformovaných spermií u samců delečních linií vedoucí ke vzniku potencionálního alternativního ATG (B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup>, B6N.*Fmr1nb* $\Delta 72$ ) a B6N ( $P = 0,001$ ;  $P = 0,005$  – stanoveno Man – Whitneyovým testem; viz Graf 8.).

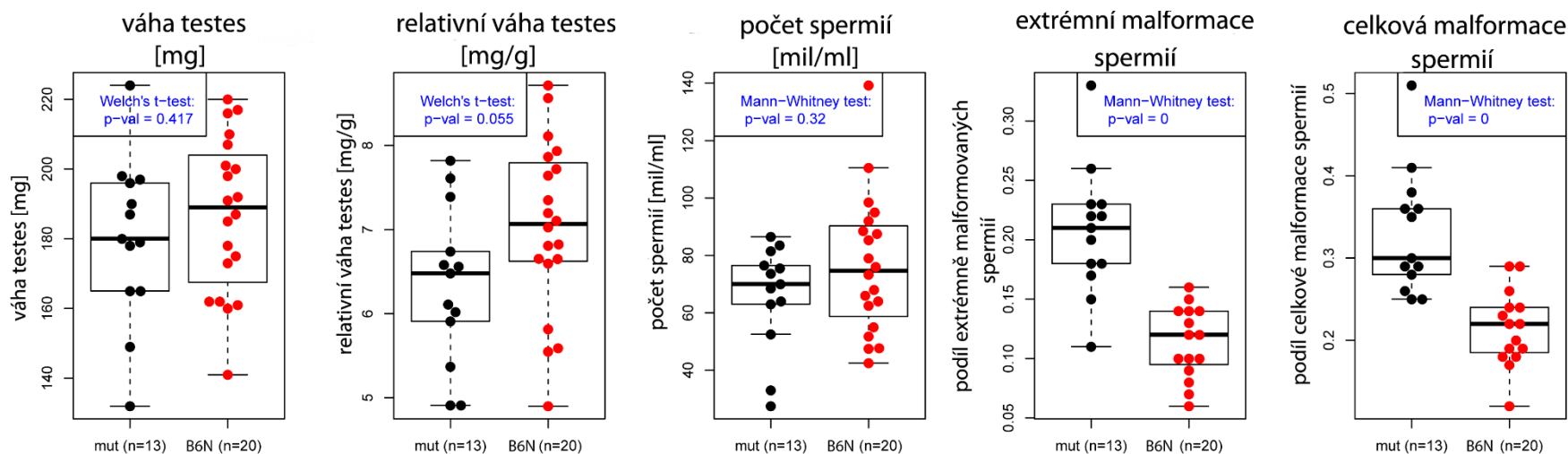
Za druhé byla data tříděna v závislosti na věku analyzovaných samců. Protože nebylo možné přímo ovlivnit stáří myši s delečními mutacemi, které byly obdrženy z laboratoře prof. Sedláčka pro analýzu, byly vytvořeny dvě kategorie dle stáří myši. Jednak ty, jejichž věk byl v rozmezí 8 - 13 týdnů a myši starší 14 týdnů. S nimi byly porovnávány kontrolní myši stejného stáří. (viz graf 9. a 10.). Mediány hodnot počtu extrémně malformovaných spermií

samců delečních linií i extrémně malformovaných spermii vykazovaly signifikantní rozdíl mezi delečními mutantami (zahrnující B6.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup>, B6.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>, B6.*Fmr1nb*<sup>Δ102</sup>, B6.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup>, stáří 8-13 týdnů) a kontrolami (B6N) (P = 0,001, P = 0,002, stanoveno Man--Whitneyovým testem). Ostatní hodnoty parametrů fertility se mezi těmito dvěma skupinami statisticky významně nelišily (viz graf 9.). Mezi delečními liniemi, jejichž stáří bylo více jak 14 týdnů (B6.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup>, B6.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>, B6.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup>, B6.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup>) a B6N byl pozorován statisticky signifikantní rozdíl pouze v mediánu hodnot počtu extrémně malformovaných spermii a celkové malformace spermii (P = 0, P = 0,026, stanoveno Man - Whitneyovým testem) (viz graf 10.). Se statistickou analýzou a její grafickou prezentací pomáhal Mgr. Václav Gergelits.

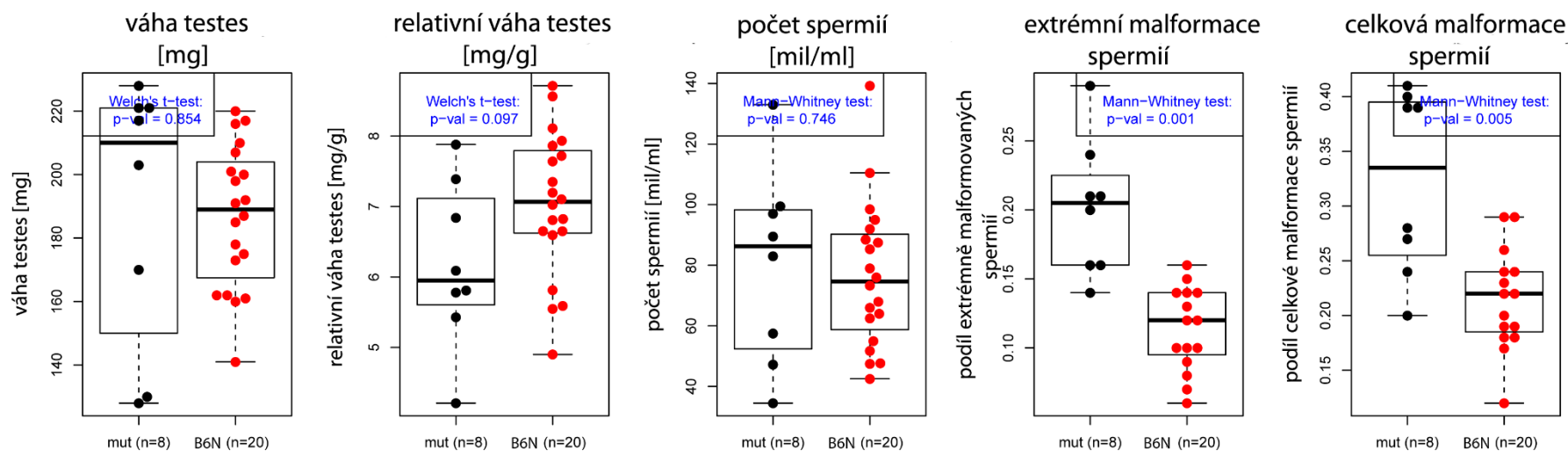
Shrnující tabulka v příloze 1. obsahuje: průměrné váhy *testes*, počet spermii a poměrné zastoupení morfologických abnormalit spermii a směrodatnou odchylku u inbredních kmenů (B6J, B6N a PWD) u B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup>, u parciálních konzomických kmenů (B6J.PWD-Chr X.1, B6J.PWD-Chr X.1s a B6J.PWD-Chr X.2) a hybridních samců (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 a (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1). Samci B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> bez ohledu na věk jejich věk vykazovali vyšší poměr morfologicky abnormálních spermii ( $33 \pm 7,6$ ) než kontrolní samci inbredního kmene ( $21 \pm 5$ ). Podobný fenotyp pozorujeme u subkonzomických kmenů (B6J.PWD-Chr X.1s a B6J.PWD-Chr X.2, u kterých poměrné zastoupení malformovaných spermii je  $54 \pm 12,73$  a  $54 \pm 5,66$ ).



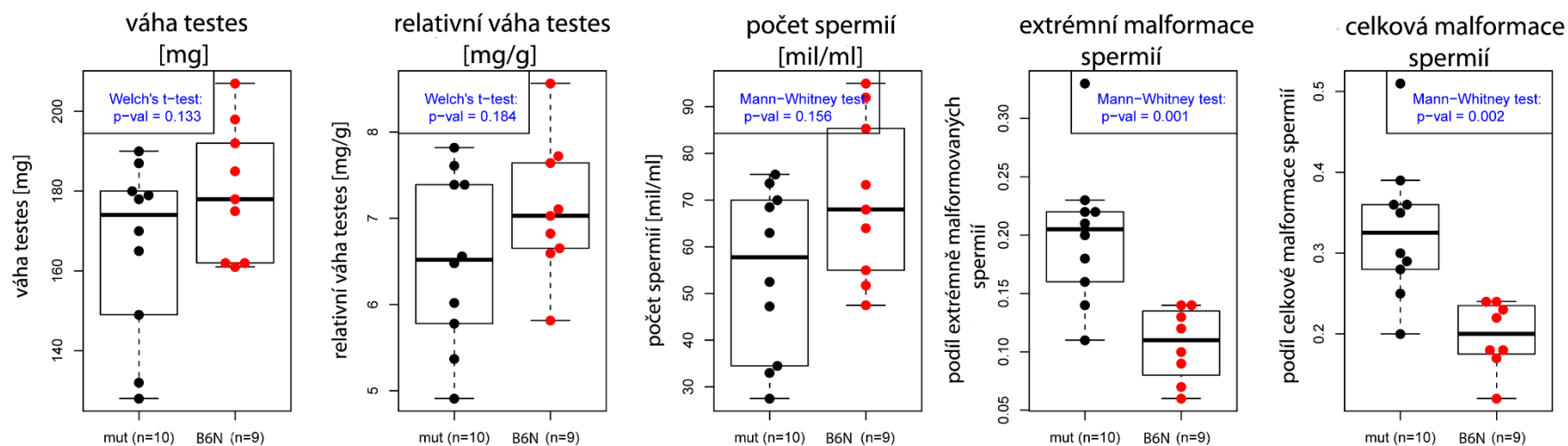
Graf 6.: Krabicový graf („boxplot“) - Statistické vyhodnocení rozdílů v parametrech fertility mezi samci delečních linií a kontrolní skupinou samců inbredního kmene B6N. Tlustá horizontální čára v rámci boxu znázorňuje medián a dolní a horní hrana obdélníku je pojmenována jako kvartily, protože rozdělují statistický soubor dat na čtvrtiny. To znamená, že 25% dat má hodnotu pod dolním kvartilem a 75% dat má hodnotu pod horním kvartilem. Tzv. „vousy“ – kolmé čáry na obdélníky vymezují pozorování ve vzdálenosti maximálně 1,5 násobku mezikvartilového rozpětí od dolního resp. horního kvartilu. Jednotlivé deleční linie (mut) jsou označeny barevnými body (viz legenda napravo). Počet jedinců použitých pro analýzu je uveden v závorce (n). P-hodnota – p-val je vždy uvedena v rohu grafu s použitým typem statistického testu.



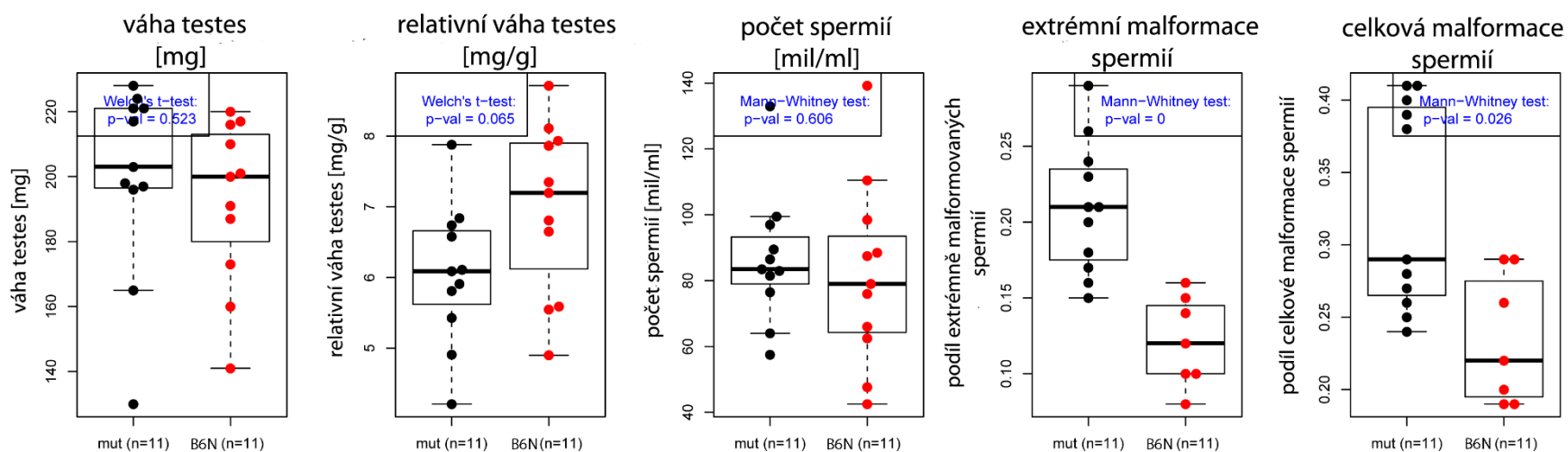
Graf 7.: Porovnání parametrů fertility samců delečních linií, které ruší start kodon ATG s kontrolní skupinou samců inbredního kmene B6N. Deleční linie (mut) jsou označeny černými kolečky a zahrnují delece: 23 nt, 102 nt, 237, nt, 367 nt. Počet jedinců použitých pro analýzu je uveden v závorce (n). P-hodnota – p-val je vždy uvedena v pravém nebo levém horním rohu grafu s použitým typem statistického testu (modře).



Graf 8.: Porovnání parametrů fertility samců delečních linií, které vedou ke vzniku alternativního start kodonu ATG a kontrolní skupiny kmene B6N. Deleční linie (mut) jsou označeny tmavými kolečky a zahrnují delece: 72 nt a 16 nt spojenou se substitucí 2 AMK. Počet jedinců použitých pro analýzu je uveden v závorce (n). P-hodnota – p-val je vždy uvedena v levém horním rohu grafu s použitým typem statistického testu (modře).



Graf 9.: Porovnání parametrů fertility u samců delečních linií s kontrolní skupinou samců inbredního kmene B6N ve věku 8 – 13 týdnů. Deleční linie jsou označeny tmavými kolečky a zahrnují delece: 23 nt (n=1), 72 nt (n=2), 102 nt (n=2) a 237nt (n=5). Počet jedinců použitých pro analýzu je uveden v závorce (n). P-hodnota – p-val je vždy uvedena v levém nebo pravém horním rohu grafu s použitým typem statistického testu (modře).

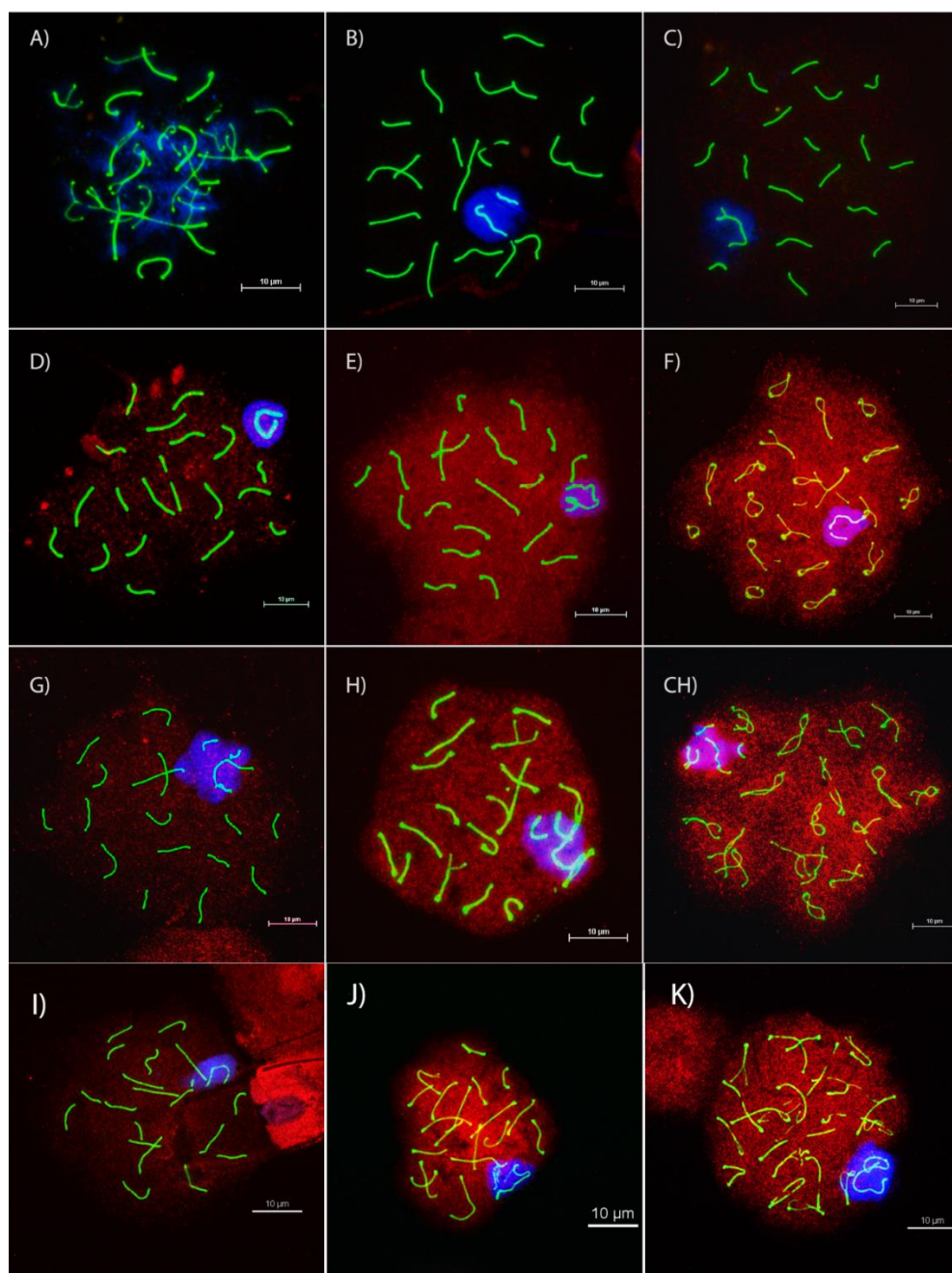


Graf 10.: **Porovnání parametrů fertility u samců delečních linií a kontrolní skupiny B6N starších více než 14 týdnů.** Deleční linie jsou označeny černými body a zahrnují delece 16 nt spojenou se substitucí 2 AMK (n=2), 72 nt (n=4), 237 nt (n=3), 367 nt (n=2). Počet jedinců použitých pro analýzu je uveden v závorce (n). P-hodnota – p-val je vždy uvedena v levém horním rohu grafu s použitým typem statistického testu (modře).

#### 5.1.4.2 Průběh meiotické profáze I u samců delečních linií genu *Fmr1nb*

Samci jednotlivých linií s delecí v genu *Fmr1nb* byli usmrceni a podrobeni pitvě. Po stanovení základních parametrů fertility (viz předchozí kapitola 5.1.4.1 Základní parametry fertility u samců delečních linií genu *Fmr1nb*) bylo jedno *testis* použito k přípravě roztěrových („spread“) meiotických preparátů. Analýza meiotické profáze I na těchto preparátech byla provedena pomocí imunofluorescenční mikroskopie s panelem protilátek proti specifickým meiotickým proteinům, jmenovitě proti SYCP3,  $\gamma$ H2AX, H1t a HORMAD2, centromerickým proteinům (CEN), SYCP1 a MLH1 (viz obrázek 12., kapitola 4.2.3 Fenotypizace). Tři kombinace protilátek umožnily stanovit: (1) relativní zastoupení vybraných stádií v profázi I a stupeň asynapse s protilátkami proti: SYCP3,  $\gamma$ H2AX a H1t (viz obrázek 17.); (2) rozsah asynapse homologních chromozomů pomocí protilátek proti: SYCP3, HORMAD2 a CEN; (3) frekvenci homologní rekombinace pomocí protilátek proti: SYCP1, MLH1 a CEN.





Obrázek 17.: Stádia profáze meiózy I - normální průběh u samic inbredního kmene B6N a jeho anomálie u delečních linií *Fmr1nb<sup>mut</sup>* a jejich kříženců s PWD. Imunofluorescenční mikroskopie detekovala testikulární variantu histonu H1, H1t (červená barva); protein synaptonemálního komplexu 3, SYCP3 (zelená barva) a fosforylovanou formu histonu H2AX,  $\gamma$ H2AX (modrá barva). Jednotlivá stádia primárních spermatocytů byla určena podle stoupající intenzity signálu imunobarvení H1t v průběhu profáze meiózy I, tvaru axiálních elementů synaptonemálního komplexu, jehož součástí je SYCP3, tvaru XY tělíska a v neposlední řadě přítomností a rozsahu  $\gamma$ H2AX asociovaného s nesynapsovaným a umlčeným chromatinem a v raných stádiích spermatocytů s dvouvláknovými zlomy DNA. A) zygotene, B6N; B) rané pachytene, B6N; C) rané pachytene, B6N; D) střední pachytene, B6N, E) pozdní pachytene, B6N; F) diplotene, B6N, G) abnormální střední pachytene, (B6N.*Fmr1nb<sup>mut</sup>* x PWD)F1, H) abnormální pozdní pachytene, (B6N.*Fmr1nb<sup>mut</sup>* x PWD)F1, CH) abnormální diplotene, (B6N.*Fmr1nb<sup>mut</sup>* x PWD)F1, I) abnormální střední pachytene B6N.*Fmr1nb<sup>mut</sup>*, J) abnormální pozdní pachytene, B6N.*Fmr1nb<sup>mut</sup>*, K) abnormální diplotene, B6N.*Fmr1nb<sup>mut</sup>*.

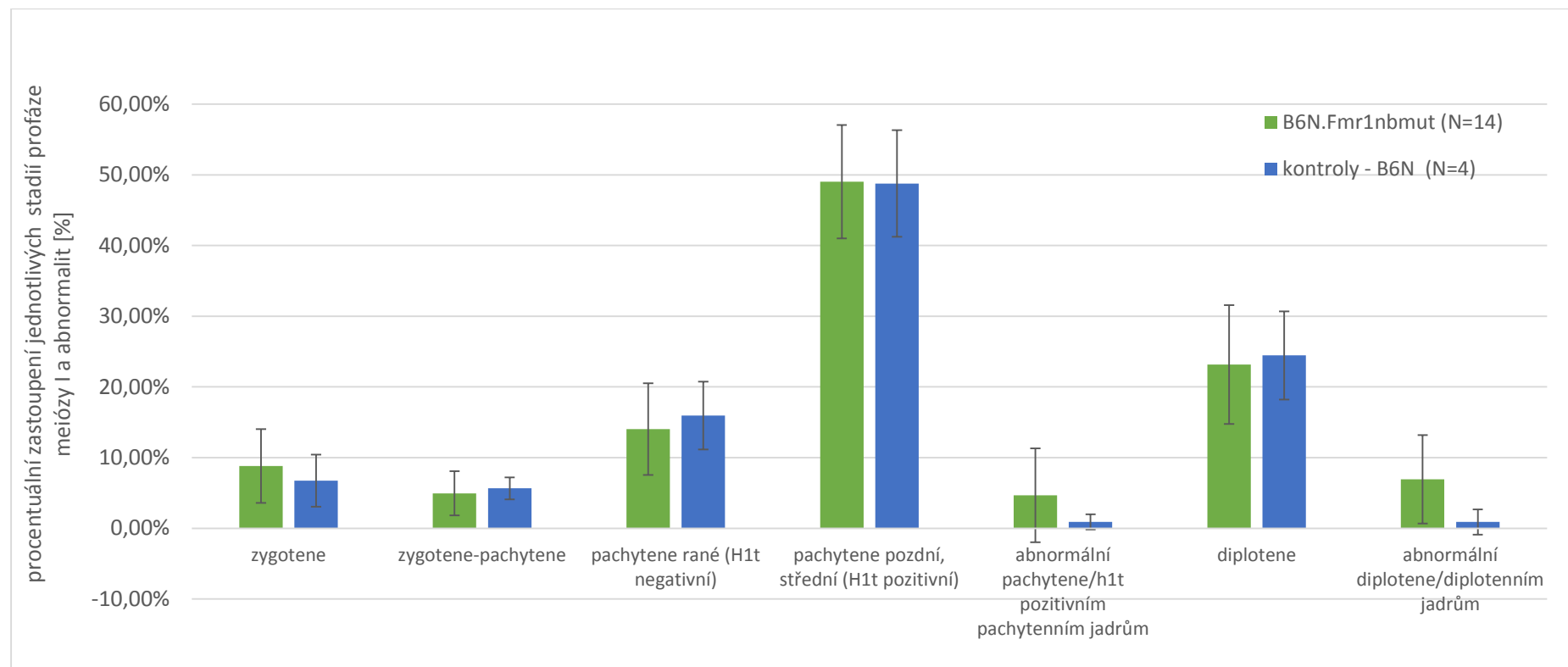
Pro základní posouzení stadií a průběhu meiotické profáze I u tří skupin samců (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup>, (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 a B6N) bylo provedeno imunobarvení meiotických preparátů pomocí protilátek proti SYCP3, proti H1t a proti  $\gamma$ H2AX. Imunobarvení SYCP3, který je základním komponentem axiálního elementu synaptonemálního komplexu, sloužilo ke sledování změn tvaru axiálních elementů, párování a následnou disjunkci homologních chromozomů. Výskyt a množství testikulárního linkerového histonu H1t v chromatinu primárních spermatocytů roste od raných stadií a dosahuje maxima v diplotenních spermatocytech. Odhadem intenzity imunobarvení H1t a přiřazením na standardní škálu intenzit u kontrolní skupiny samců B6N byla stanovena stadia jednotlivých spermatocytů, včetně pachytenních substádií (rané a střední, respektive pozdní pachytene). V úvahu byl brán i tvar a velikost XY tělíska (pohlavního tělíska), označeného  $\gamma$ H2AX. Nespárovaný, asynapsovaný/umlčený chromatin homologních chromozomů byl detekován protilátkou proti  $\gamma$ H2AX.

Skupina mutantních linií B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> (zahrnující mutace Sub2AA,  $\Delta$ 23,  $\Delta$ 72,  $\Delta$ 23,  $\Delta$ 102 a  $\Delta$ 237) nevykazovala rozdílné zastoupení stadií v profázi oproti kontrolním myším čistého inbredního kmene B6N. Výjimku tvořila pouze deleční linie B6N.*Fmr1nb* <sup>$\Delta$ 367</sup>, kde byl pozorován mírný nárůst v počtu pachytenních jader a naopak mírný pokles diplototenních stadií. Tento trend koreloval u této deleční linie i s vyšším procentuálním zastoupením abnormálních pachytenních spermatocytů ( $18,86\% \pm 4,33\%$ ) a diplotenních spermatocytů ( $14,86\% \pm 4,7\%$ ) oproti kontrolním myším (B6N) (abnormality v pachyteních i diplotenních jádrech bylo  $<1\%$ , viz graf. 12.). Navíc abnormality, pozorované u B6N.*Fmr1nb* <sup>$\Delta$ 367</sup> v pachytenních a diplotenních spermatocytech, byly podobné asynapsím pozorovaným u (B6N.*Fmr1nb* x PWD)F1 (viz obrázek 17., body: G, H a CH). Oproti tomu u zbylých delečních linií B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> (zahrnující mutace (mut) Sub2AA,  $\Delta$ 23,  $\Delta$ 72,  $\Delta$ 23,  $\Delta$ 102 a  $\Delta$ 237) byly pozorovány jen krátké asynapse autozomů, které se vyskytovaly v blízkosti pohlavního tělíska (viz obrázek 17., body: I, J a K).

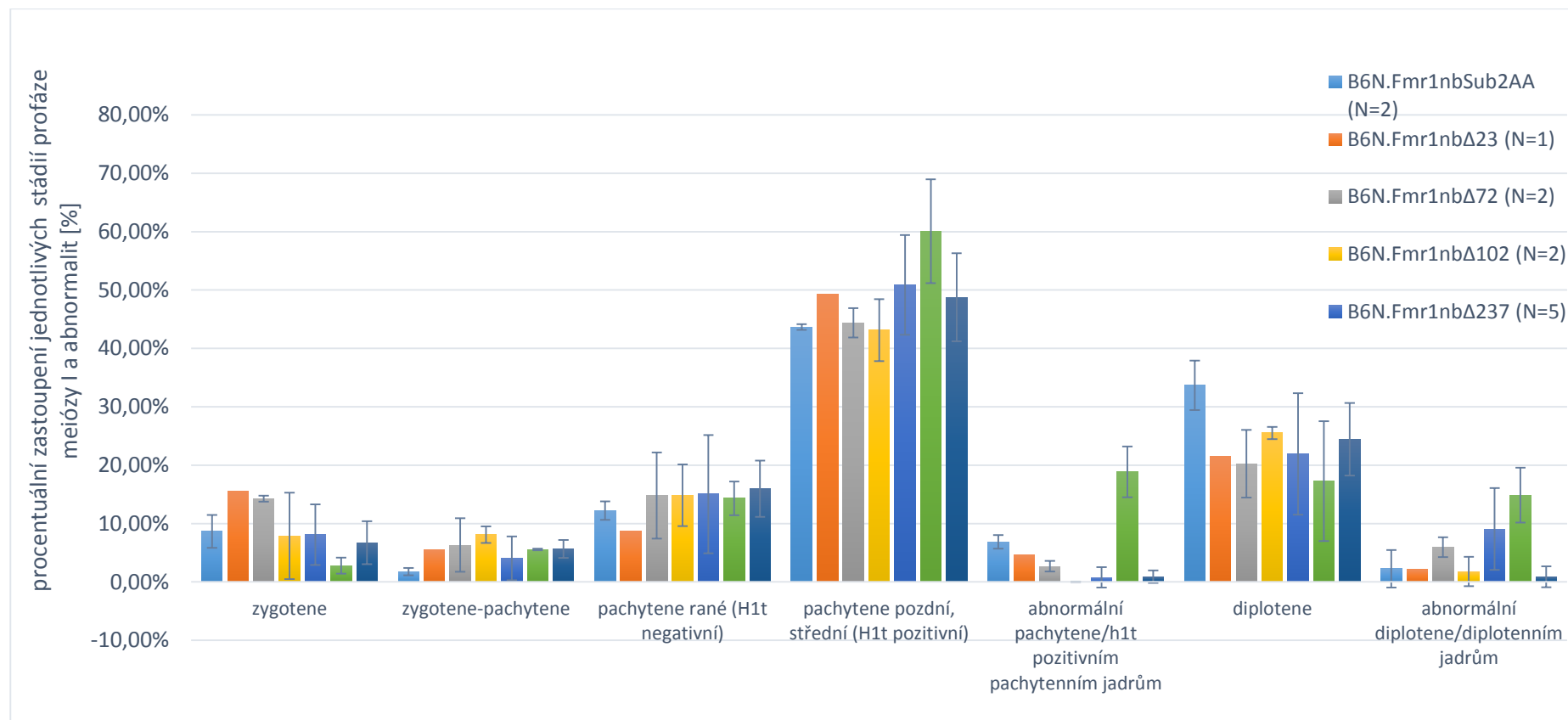
Při porovnání všech mutantních linií s kontrolními samci B6N se ale rozdíl v zastoupení stadií profáze I stíral (viz graf 11.). Podobně i procentuální zastoupení abnormalit bylo sice vyšší než u kontrolních samců, ale bylo stále nízké. U B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> byla hodnota počtu abnormálních pachytenních jader vyhodnocených ku celkovému počtu H1t pozitivních pachytenních spermatocytů  $4,67\% \pm 6,64\%$ . Podíl abnormálních diplotenních jader z celkového počtu diplotenních spermatocytů byla hodnota  $6,95\% \pm 6,25\%$ . Ve srovnání

u kontrolních myší (B6N) byl podíl abnormalit v pachytenních a diplotenních jádrech nižší než 1 % (viz graf 11.).

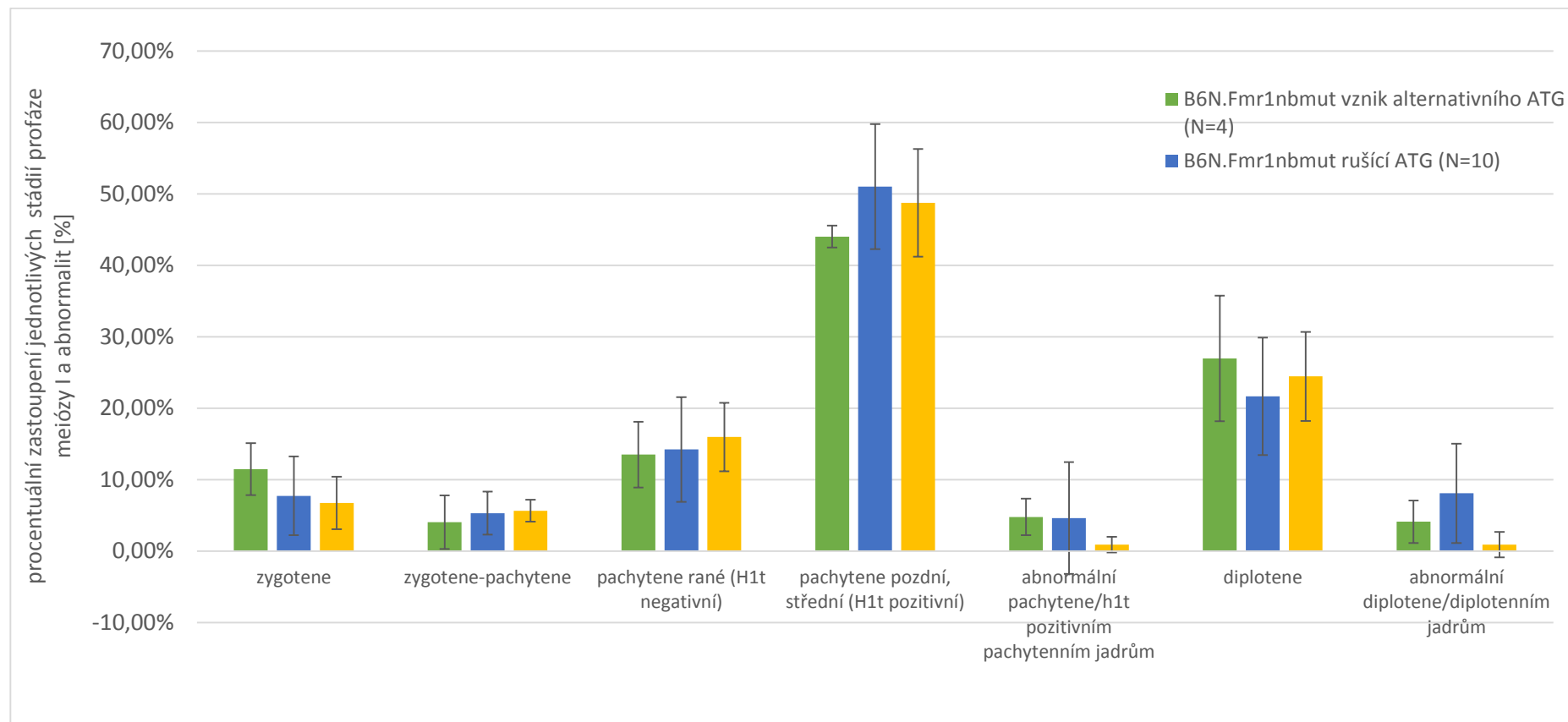
V grafu 12. jsou znázorněny hodnoty delečních linií, které nemají původní start kodon ATG (B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ102</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup>), deleční linie, jež nesou potenciální alternativní kodon ATG (B6N. *Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup> a B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>) a kontrolní myši inbredního kmene (B6N). Pokud by start kodon ATG byl ve správném sekvenčním kontextu a ve správné vzdálenosti od 5' konce mRNA (ZUR a TULLER 2013), mohl by vzniknout protein a je proto vhodné porovnat obě skupiny nezávisle. V rozložení stádií profáze meiózy I není pozorován výrazný rozdíl mezi třemi skupinami. Oproti kontrolním myším a myším, u nichž delece vedla ke vzniku potenciálního start kodonu ATG, byl u myší, které neměly původní start kodon ATG, pozorován mírný nárůst abnormálních diplotenních stádií vyhodnocených ku celkovému počtu diplotenních jader (8,08 % ± 6,97 %) (viz graf 12.).



Graf 11. **Zastoupení stádií profáze meiózy I (od zygotenních do diplotenních spermatocytů) a zastoupení abnormalit v pachytenních a diplotenních jádrech u skupiny samců delečních linií genu *Fmr1nb* proti kontrolní skupině B6N.** Jako marker pro identifikaci raných a pozdních pachytenních jader posloužila protilátka proti testikulární histonové variantě H1, H1t, která se slabě objevuje od raného pachytene, případně od středního pachytene ve vyšším množství. Na ose X jsou vyobrazena jednotlivá stadia profáze meiózy I (od zygotenních → po diplotenní spermatocyty). Abnormality jsou zobrazeny v pachytenních H1t pozitivních jádrech a diplotenních jádrech. Hodnota na ose Y představuje poměrné zastoupení stádií profáze meiózy I a abnormalit. Abnormality v H1t pozitivních pachytenních spermatocytech jsou vyhodnoceny ku celkovému počtu H1t pozitivních pachytenních jader. Abnormality v diplotenních stádiích jsou vyhodnoceny ku celkovému počtu diplotenních jader. N = počet jedinců, B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup>= B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ102</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup>

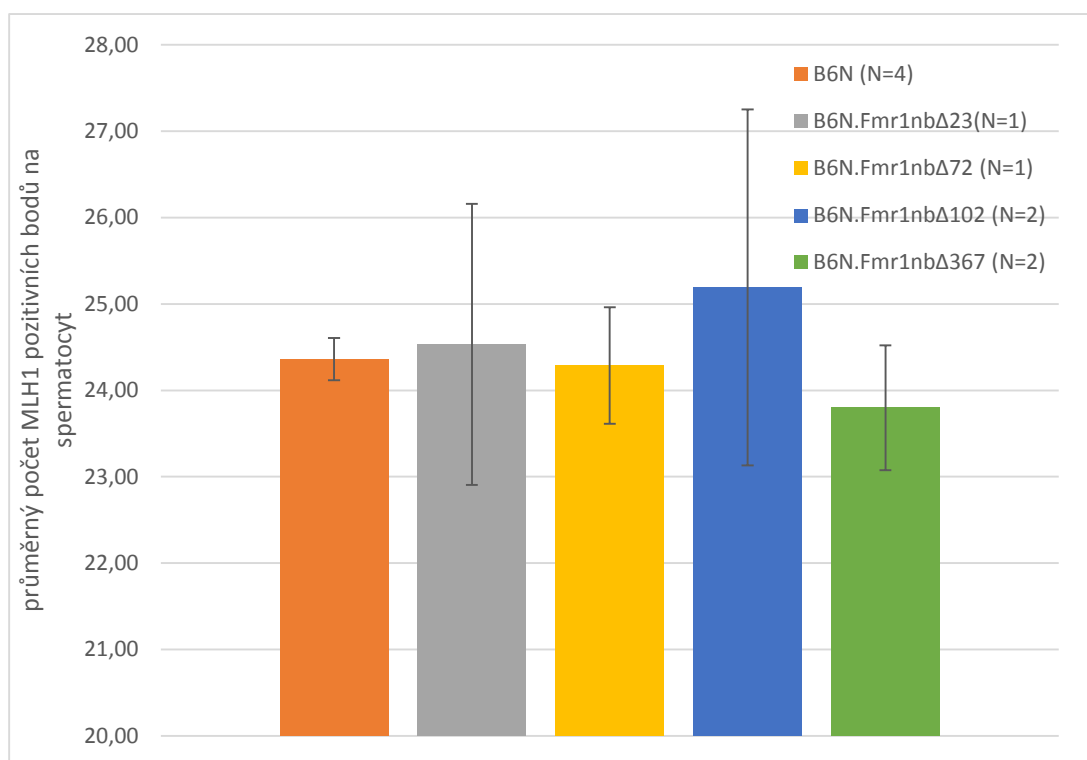


Graf 12.: Zastoupení stádií samčí profáze meiózy I (od zygotenních do diplotenních spermatocytů) a zastoupení abnormalit v pachytenních a diplotenních jádrech u jednotlivých delečních linií genu *Fmr1nb* a kontrol B6N. Jako marker pro identifikaci raných a pozdních pachytenních jader posloužila protilátka proti testikulární histonové variantě H1, H1t, která se slabě objevuje od raného pachytene, případně od středního pachytene ve vyšším množství. Na ose X jsou vyobrazeny jednotlivá stadia profáze meiózy I (od zygotenních → po diplotenní spermatocyty). Abnormality jsou zobrazeny v pachytenních H1t pozitivních jádrech a diplotenních jádrech. Hodnota na ose Y představuje poměrné zastoupení stádií profáze meiózy I a abnormalit. Abnormality v H1t pozitivních pachytenních spermatocytech jsou vyhodnoceny ku celkovému počtu H1t pozitivních pachytenních jader. Abnormality v diplotenních stádiích jsou vyhodnoceny ku celkovému počtu diplotenních jader. N = počet jedinců.



Graf 13.: Zastoupení stádií profáze samčí meiózy I (od spermatocytů zygotenních po diplotenní) a zastoupení abnormalit v pachytenních a diplotenních jádrech. Porovnání skupiny delečních linií genu *Fmr1nb*, které mají start kodon ATG vydeletovaný anebo nesou potenciální alternativní start kodon ATG, a kontrol B6N. Jako marker pro identifikaci raných a pozdních pachytenních jader posloužila protilátka proti testikulární histonové variantě H1, H1t, která se slabě objevuje od raného pachytene, případně od středního pachytene ve vyšším množství. Na ose X jsou vyobrazeny jednotlivá stadia profáze meiózy I (od zygotenních → po diplotenní spermatocyty). Abnormality jsou zobrazeny v pachytenních H1t pozitivních jádrech a diplotenních jádrech. Hodnota na ose Y představuje poměrné zastoupení stádií profáze meiózy I a abnormalit. Abnormality v H1t pozitivních pachytenních spermatocytech jsou vyhodnoceny ku celkovému počtu H1t pozitivních pachytenních jader. Abnormality v diplotenních stádiích jsou vyhodnoceny ku celkovému počtu diplotenních jader. N = počet jedinců. **Deleční linie rušící ATG start kodon ATG** = B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ102</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup>. **Deleční linie nesoucí potenciální alternativní start kodon ATG** = B6.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup>, B6.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>

I kdyby gen *Fmr1nb* neměl přímou souvislost s hybridní sterilitou, mohl by mít nějakou roli v meiotické homologní rekombinaci. Aby mohla být tato hypotéza testována, byl určen počet crossing-overů (CO) u vybraných zástupců delečních linií genu *Fmr1nb*. Místa CO byla určena fluorescenční mikroskopií, která vizualizovala místa rekombinačních nodulů, značením pomocí protilátky proti MLH1 (marker CO). Pokud by gen *Fmr1nb* skutečně hrál roli v rekombinaci, mohl by způsobit snížení počtu rekombinačních uzlů (MLH1 pozitivní body). Ačkoliv u *B6N.Fmr1nb<sup>Δ367</sup>* došlo k mírnému snížení průměrného počtu MLH1 nodulů na pachytenní spermatocyt ( $23,8 \pm 0,72$ ) tak u ostatních zástupců mutantních linií genu *Fmr1nb* tento trend nevidíme (pro *B6N.Fmr1nb<sup>Δ23</sup>* průměrný počet pozitivních bodů MLH1 na spermatocyt byl  $24,5 \pm 1,6$ ; poté u *B6N.Fmr1nb<sup>Δ72</sup>*  $24,3 \pm 0,7$  a obdobně i u *B6N.Fmr1nb<sup>Δ102</sup>*:  $25,2 \pm 2$ . Průměrný počet MLH1 pozitivních bodů na spermatocyt u samců inbredního kmene B6N je  $24,4 \pm 0,24$  (viz graf 14.).

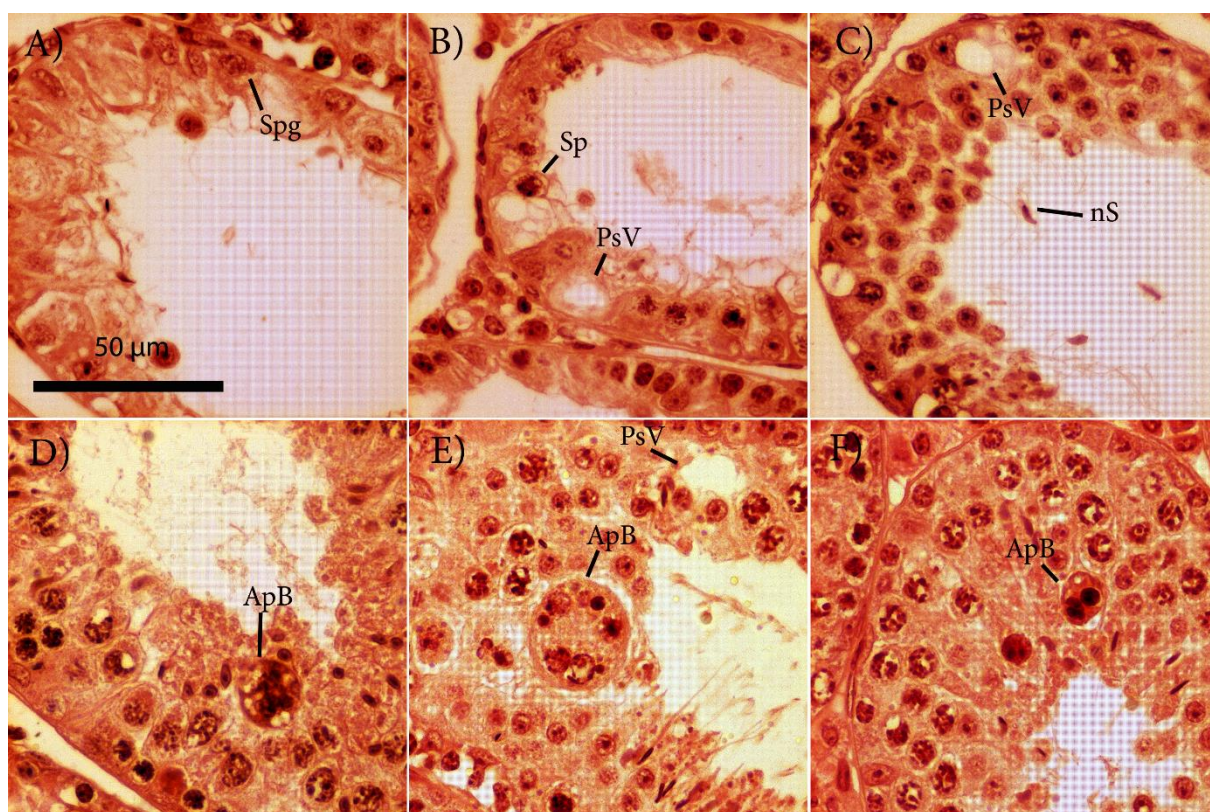


**Graf 14.: Průměrný počet MLH1 pozitivních bodů na spermatocyt.** Pomocí imunofluorescenční mikroskopie s protilátkami proti SYCP1, MLH1, Dapi a CEN, byly nalezeny pachytenní jádra s pozitivním signálem MLH1. U pozitivních vyfocených jader bylo následně v programu NIS - elements odečten počet signálů MLH1 (značící místa rekombinace). Na ose X jsou vyobrazeni jednotliví zástupci *B6N.Fmr1nb<sup>mut</sup>*, u nichž byla provedena analýza počtu MLH1 pozitivních bodů. Hodnota na ose Y pak představuje průměrný počet bodových signálů MLH1 v pachytenním spermatocyty.



#### 5.1.4.3 Histologie testes delečních linií B6N.*Fmrnb*<sup>mut</sup> a kontrolních samců (B6N)

U samců s delecí genu *Fmr1nb* a u kontrolních samců B6N byla provedena pitva a změřeny nebo vypočítány základní parametry fertility a připraveny roztěrové preparáty (viz kapitola 5.1.4.1). Druhé *testis* bylo zafixováno a posloužilo pro přípravu histologických řezů. Ty byly následně barveny standardním protokolem s hematoxylinem-eozinem. Pak byly z pořízených mikrofotografií histologických řezů určeny kategorie kanálků podle zastoupení spermatogenních buněk: (A) *obsahující dva typy spermatid – elongované a kulaté*, (B) *kanálek s jedním typem spermatid*, (C) *kanálek s dvěma typy spermatid, přičemž elongované jsou s bičkem* (viz obrázek 14. v kapitole 4.2.3.4 Histologické řezy *testes*). Patologické kanálky byly spojeny se zástavou spermatogeneze, přítomností kulatých prázdných míst tzv. „pseudovakuol“ a přítomností apoptotických buněk. Viz obrázek 18.



Obrázek 18.: **Histologické řezy *testis*, typy patologií** – A) zástava spermatogeneze ve spermatogoniích u B6N.*Fmr1nb*<sup>2AASub</sup>. B) zástava spermatogeneze ve spermatocytech u B6N.*Fmr1nb*<sup>2AASub</sup>. C) kanálek obsahující „pseudovakuolu“ – potrhání lumen kanálku v důsledku apoptózy u B6N.*Fmr1nb*<sup>2AASub</sup>. Ve středu kanálku jsou vidět patologické spermie (hlavička a bičík byly od sebe separovány). D), E) a F) Kanálky obsahující apoptotické buňky u B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup>. Spg – spermatogonie, Sp – spermatocyty, nS – patologické spermie (separace hlavičky a bičíku), PsV – „pseudovakuola“, ApB – apoptotická buňka.

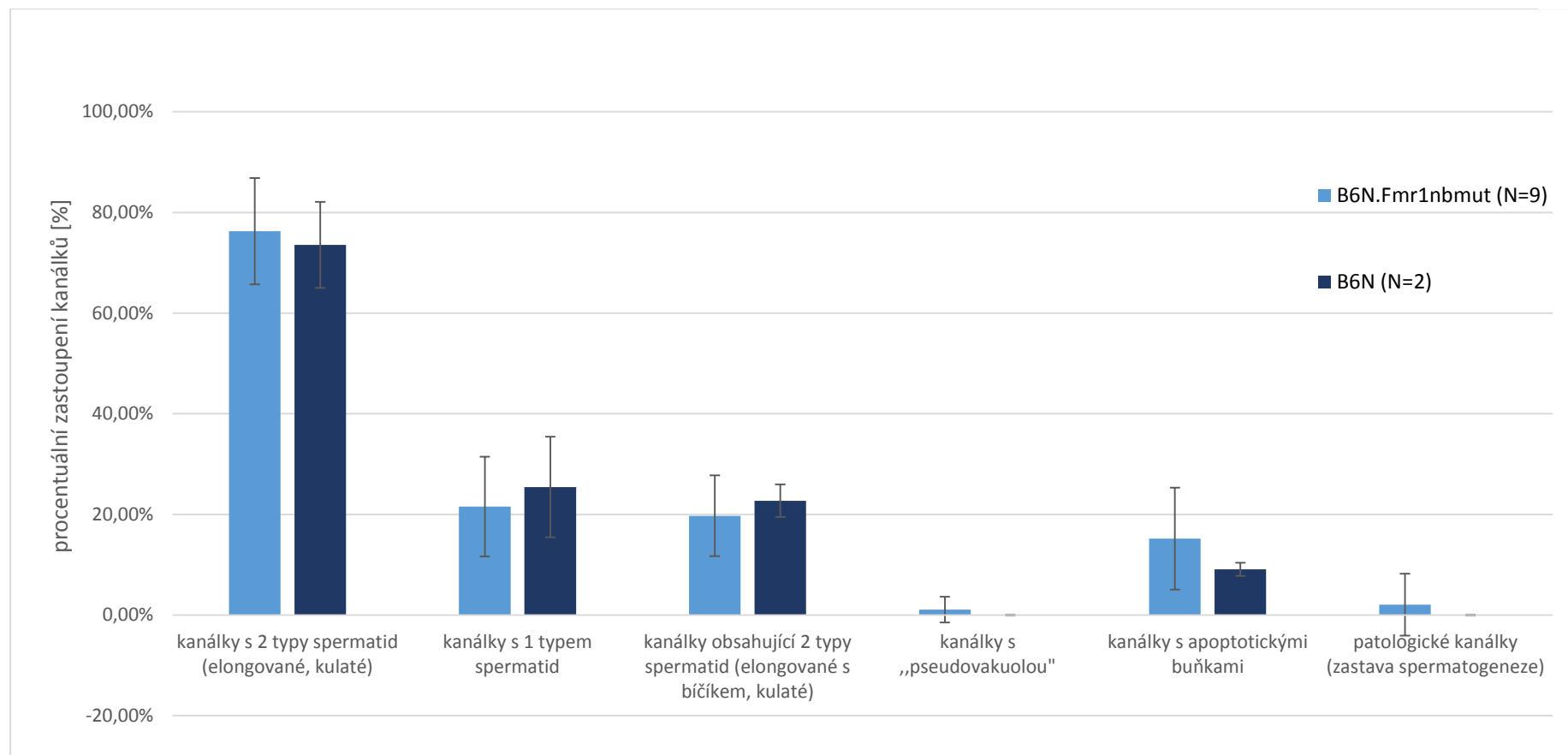
Data byla vyhodnocena pomocí základních statistických funkcí v programu MS Excel: aritmetický průměr a směrodatná odchylka a vynesena do grafů (graf 15. a 16.).



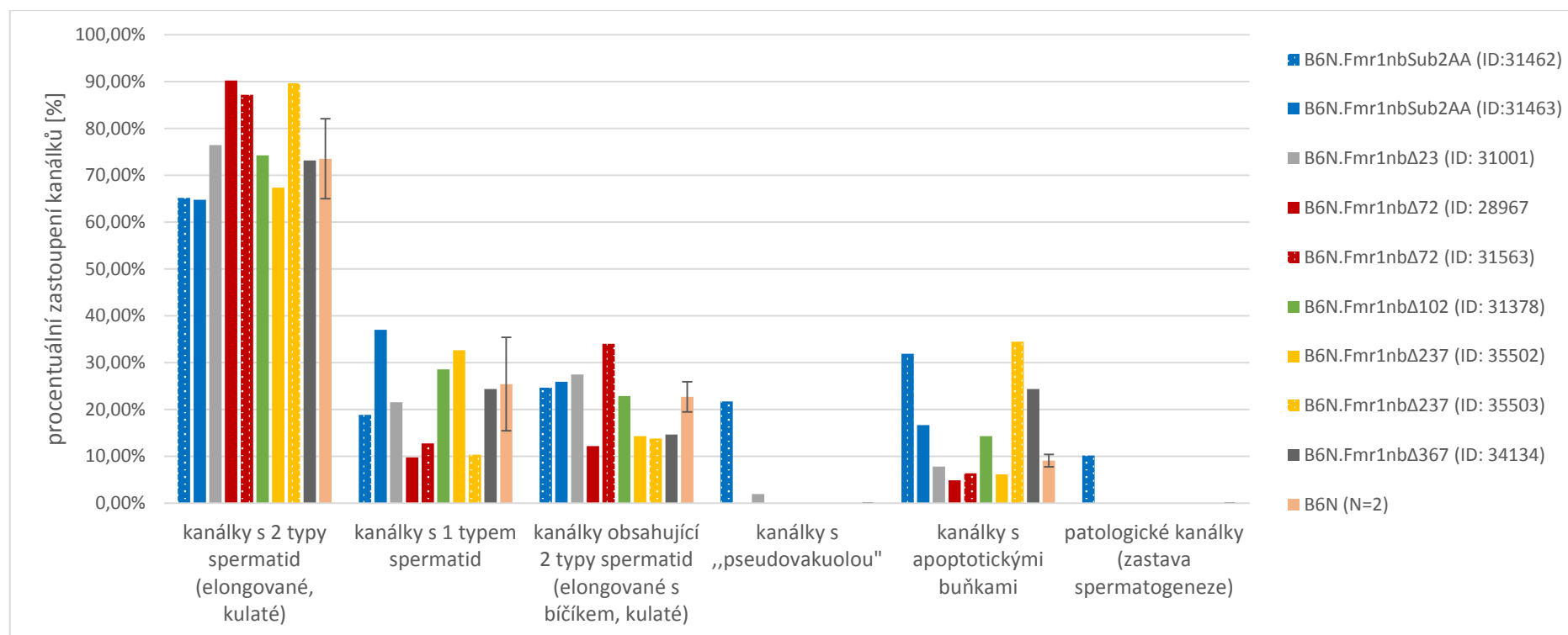
Hodnoty charakterizující spermiogenezi skupiny samců delečních linií vůči skupině kontrol B6N byly vyneseny v grafu 15. Zastoupení kategorií kanálků se neliší mezi B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> (zahrnující mutace (mut) = Sub2AA, Δ23, Δ72, Δ102, Δ237, Δ367) a kontrolními samci kmene B6N. Patologické kanálky byly jen zřídka pozorovány. Výjimku tvoří pouze přítomnost kanálků obsahujících apoptotické buňky. Apoptóza je ale běžnou součástí spermatogeneze i u kontrolních samců (počet kanálku u B6N obsahující minimálně jednu apoptotickou buňku byl 9,08 % ± 1,3 %). U B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> byl počet kanálků obsahující alespoň jednu apoptotickou buňku 14,38 % ± 10,52 %.

Dále byly vyneseny hodnoty pro jednotlivé deleční linie vůči skupině kontrol B6N (graf 16.). Analyzovány byly vždy mutantní linie vykazující snížení váhy *testes* a počtu spermií a současně stejná mutantní linie, která toto snížení nevykazovala (v grafu je sterilnější fenotyp označen šrafováním). U myši se sníženou váhou *testes* a počtem spermií lze pozorovat korelaci s častějším výskytem kanálků obsahujících apoptotické buňky. U samce s identifikačním číslem (ID) 31563 (deleční linie B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>) bylo poměrné zastoupení kanálků obsahujících alespoň jednu apoptotickou buňku 6,38 %. Jeho váha *testes* byla 128 mg a počet spermií 34,5 mil/ml. Samec s ID 28967 stejné deleční linie bylo poměrné zastoupení kanálků obsahujících alespoň jednu apoptotickou buňku 4,88 % a jeho váha *testes* byla 170 mg a počet spermií byl 47,25 mil/ml. U samce deleční linie Δ237 (ID: 35503) bylo poměrné zastoupení kanálků obsahujících alespoň jednu apoptotickou buňku 34,48 % (váha *testes*: 132 mg a počet spermií 33 mil/ml) a u samce s ID 35502 (deleční linie Δ237) bylo poměrné zastoupení kanálků obsahujících alespoň jednu apoptotickou buňku 6,12 % (váha *testes*: 180 mg a počet spermií 75,5 mil/ml). Podobně nárůst počtu kanálků obsahujících alespoň jednu apoptotickou buňku způsobila delece 367 nt (24,39 %) oproti 9,08 % ± 1,3 %, které pozorujeme u kontrolních samců B6N.

Jeden ze dvou samců B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup> (ID: 31462) vykazoval nárůst patologií, (18,46 % kanálků se zástavou spermatogeneze, 21,74 % kanálků obsahující „pseudovakuolu“ a 31,88 % kanálků obsahující alespoň jednu apoptotickou buňku) nicméně jeho sourozenec (se stejnou mutací, ID: 31463) nárůst patologií neukázal (0 % kanálků se zástavou spermatogeneze, 0 % kanálků obsahujících „pseudovakuolu“, 16,67 % kanálků obsahujících alespoň jednu apoptotickou buňku) (graf 16.). Hodnoty samce ID: 31462 nebyly proto použity do souhrnného grafu 15., který porovnává všechny deleční linie genu *Fmr1nb* vůči kontrolám.



**Graf 15.: Spermatogeneze a spermiogeneze u samců B6N.Fmr1nb<sup>mut</sup> a kontrol (B6N).** Na ose X jsou vyobrazeny jednotlivé kategorie kanálků: kanálky obsahující jeden typ spermatid (elongované, kulaté), kanálky obsahující jeden typ spermatid, kanálky obsahující elongované spermatidy s bíčkem a kulaté spermatidy, kanálky obsahující tzv. pseudovakuolu (potrhání lumen kanálku v důsledku proběhlé apoptózy), kanálky obsahující minimálně jednu apoptotickou buňku, patologické kanálky (vykazující zástavu spermatogeneze – posledním vyskytujícím se stadiem mohou být buď spermatogonie, nebo spermatocyty). Hodnota na ose Y představuje pak procentuální zastoupení kategorií kanálků. Skupina delečních mutantů označená jako **B6N.Fmr1nb<sup>mut</sup>** představuje následující mutantní linie: B6N.Fmr1nb<sup>Sub2AA</sup>, B6N.Fmr1nb<sup>Δ23</sup>, B6N.Fmr1nb<sup>Δ72</sup>, B6N.Fmr1nb<sup>Δ102</sup>, B6N.Fmr1nb<sup>Δ237</sup>, B6N.Fmr1nb<sup>Δ367</sup>, N = počet jedinců.

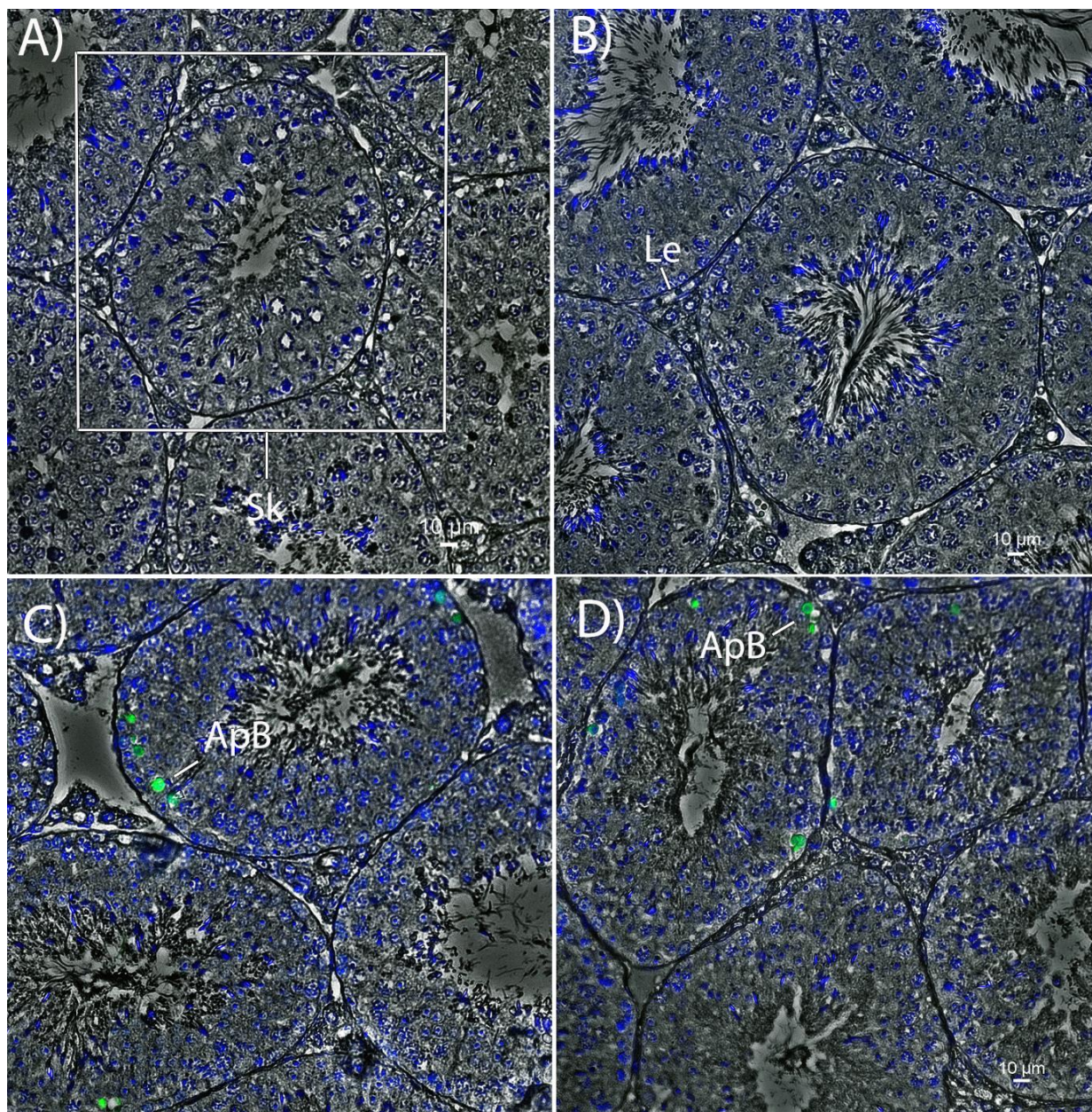


**Graf 16.: Spermatogeneze a spermiogeneze u samců s jednotlivými mutacemi B6.Fmr1nb<sup>mut</sup> a u kontrol B6N.** Na ose X jsou vyobrazeny jednotlivé kategorie kanálků: kanálky obsahující jeden typ spermatid (elongované, kulaté), kanálky obsahující jeden typ spermatid, kanálky obsahující elongované spermatidy s bíčkem a kulaté spermatidy, kanálky obsahující tzv. „pseudovakuolu“ (potrhání lumen kanálku v důsledku proběhlé apoptózy), kanálky obsahující minimálně jednu apoptotickou buňku, patologické kanálky (vykazující zástavu spermatogeneze – posledním pozorovaným stadiem mohou být buď spermatogonie, anebo spermatocyty). Šrafovaní značí myši, u nichž došlo ke snížení počtu spermií a váhy testes. Hodnota na ose Y představuje pak procentuální zastoupení kategorií kanálků. N = počet jedinců.

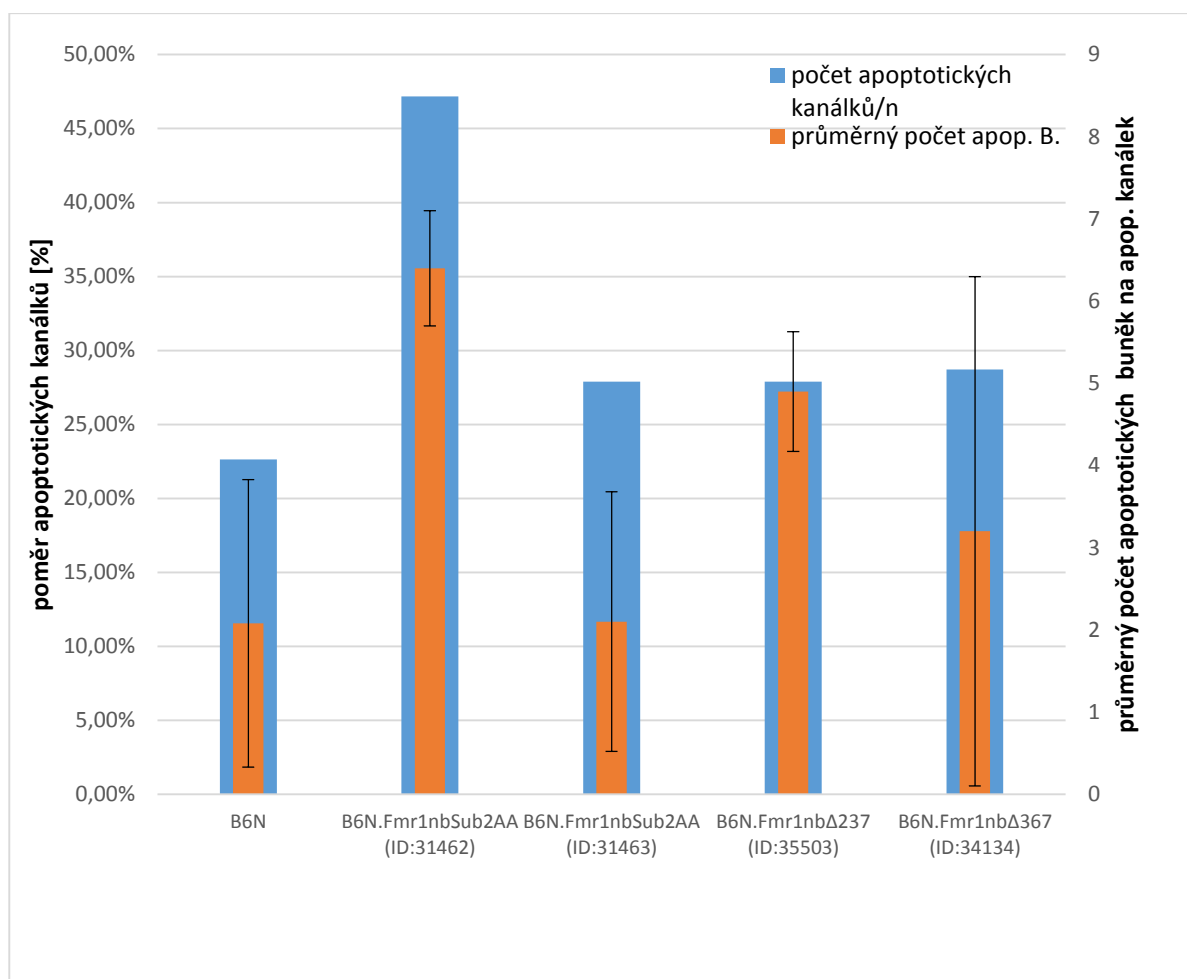
Dále byl u delečních linií B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> a u kontrol B6N stanoven počet kanálků obsahujících alespoň jednu apoptotickou buňku. Detekce apoptotických buněk na histologických řezech byla provedena fluorescenčním značením metodou TUNEL (z angl. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Apoptotické buňky se vyznačují masivním výskytem dvouvláknových zlomů, které jsou metodou TUNEL fluorescenčně vizualizovány. Na obrázku 19. jsou histologické řezy varlat s detekovanými apoptotickými buňkami (zelený signál v obrázku C a D). Počet semenotvorných kanálků obsahujících alespoň jednu apoptotickou buňku byl vyhodnocen ku celkovému počtu semenotvorných kanálků a byl vypočítán průměrný počet apoptotických buněk na apoptotický kanálek. Hodnoty obou parametrů byly vyneseny do grafu 17.

B6N.*Fmr1nb*<sup>2AASub</sup> (ID: 31462), vykazuje nadprůměrný počet apoptotických kanálků (47,17 %). Myš navíc byla sterilní s patologickými spermii (hlavička byla disociovaná od bičíku). Nicméně jeho sourozenec (se stejnou mutací, ID: 31463) tento nárůst počtu apoptotických kanálků nevykazoval (27,88 %). Mírné navýšení počtu apoptotických kanálků vykazovala mutantní linie B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup> (ID: 35503) s hodnotou 27,88 % a B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup> (ID: 34134) s hodnotou 28,71% oproti kontrolnímu samci čistého inbredního kmene B6N (22,64 %). Vyšší průměr apoptotických buněk na apoptotický kanálek byl pozorován u B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup> (ID: 31462) (6,4 buněk) a B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup> (ID: 35503) (4,9 buněk). Ale směrodatné odchylky byly vysoké. Důvodem rozkolísání dat bylo, že některé kanálky měly podlouhlý tvar a tudíž obsahovaly více buněk a tím i více apoptotických buněk. V grafu je pak pro větší přehlednost u těchto dvou zástupců mutantních linií zanesena SD/10.





Obrázek 19. **Histologické řezy *testis* se značením apoptotických buněk u *B6N.Fmr1nb<sup>mut</sup>*.** DNA chromatinu spermatogenních buněk je obarvena DAPI (modrá barva). Apoptotické buňky jsou detekovány fluorescenční TUNEL reakcí (zelená barva), Šedá barva – lumen kanálků (foceno ve fázovém kontrastu) A) kontrola – bez přidání TdT, B) histologický řez *testes* bez výskytu apoptotických kanálků u B6N C) a D) patologické histologické řezy *testis* u *B6.Fmr1nb<sup>mut</sup>* (zelený signál – apoptotické buňky). Sk – semenotvorný kanálek. Le – Leydigovy buňky, ApB – apoptotické b.



**Graf 17.: Poměrné zastoupení apoptotických kanálků a apoptotických buněk.** Na ose X jsou vyneseny zástupci delečních linií *B6N.Fmr1nb<sup>mut</sup>* (zahrnující mutace = Sub2AA, Δ237, Δ367) a kontrolní samec B6N. Zástupci delečních linií byli vybráni na základě předchozí analýzy histologických řezů. Na hlavní ose Y je vyneseno poměrné zastoupení apoptotických kanálků. Na ose Y vpravo je vyneseno poměrné zastoupení apoptotických buněk na apoptotický kanálek. V druhém a čtvrtém sloupci (oranžový) pro lepší názornost grafu byla zanesena SD/10.

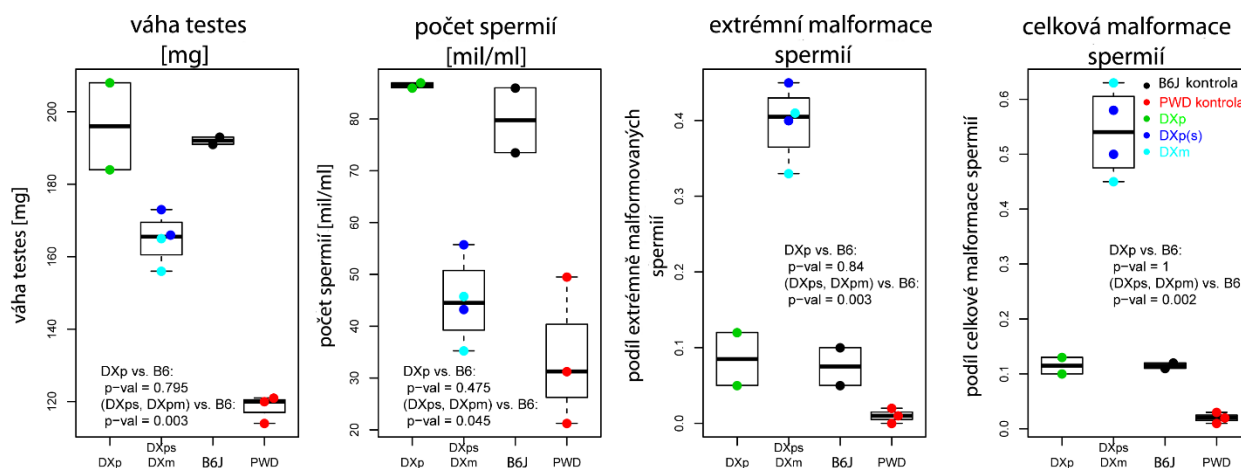
### 5.1.5 Parametry fertility u parciálních konzomických kmenů a kontrol B6J a PWD

V grafech 6. - 10. v kapitole 5.1.4.1 Základní parametry fertility u samců delečních linií genu *Fmr1nb* byl pozorován významný rozdíl mezi B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> a kontrolními samci B6N, avšak jen v kategoriích pro celkové malformace spermií a extrémní malformace spermií. Přičemž, pokud byl pozorován rozdíl mezi mutantními liniemi a kontrolními samci, nezáviselo ani na věku mutantů, ani na typu delece s, nebo bez potenciálního alternativního start kodonu ATG (viz graf: 7., 8., 9. a 10.).

Podobný fenotyp již ve své práci pozorovala i Storchová a kolegové (STORCHOVA *et.al.* 2004) a Bhattacharya a kolegové (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Oblast odpovídající za tyto abnormality v morfologii spermií byla nazvána *Hstx1*.

Modifikovaný experiment byl zopakován s použitím parciálních konzomických kmenů: B6J.PWD-Chr X.1 (v grafu 18. označený jako DXp) B6J.PWD-Chr X.1s (v grafu 18. označený jako DXp(s)) a B6J.PWD-Chr X.2 (v grafu 18. označený jako DXm). Graf 18. ukazuje, že v kategoriích základních parametrů fertility: váha *testes* ( $P = 0,003$ , stanoveno Welchovým t-testem), počet spermií ( $P = 0,003$ , stanoveno Man –Whitneyovým testem), extrémní malformace spermií ( $P = 0,003$ , stanoveno Man –Whitneyovým testem) a celková malformace spermií ( $P = 0,002$ ), je pozorován statisticky signifikantní rozdíl mezi sloučenými hodnotami dvou parciálních konzomických samců X.1s a X.2 a kontrolními samci B6J. Naopak X.1 tento signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolními samci B6J v jednotlivých kategoriích parametrů fertility nevykazoval (viz graf 18.). Do grafu 18. jsou zaneseni i samci inbredního kmene PWD.





**Graf 18.: Porovnání parametrů fertility u parciálních konzomických samců DXp, DXp(s) a DXm a kontrolních samců inbredních kmenů B6J a PWD.** Počet hodnocených samců byl ve skupině DXp (zeleně) = 2, ve skupině DXp(s) (tmavě modře) a DXm (světle modře) = 4. Počet samců ve skupině B6J (černě) = 2 a ve skupině PWD (červeně) = 3. Porovnávána byla skupina parciálních konzomických samců DXp vůči kontrolním samcům B6J (P - hodnota – p - val uvedena za zkratkami kmenů). Poté byli porovnání parciální konzomičtí samci DXm a DXp(s), kteří se od DXp liší přítomností lokusu *Hstx1*, s B6J (P - hodnota – p - val uvedena za zkratkami kmene). PWD samci jsou zaneseni do grafu pro získání lepší představivosti o tom, jak se u nich pohybují parametry fertility.



## 5.2 Ověření role genu *Fmr1nb* ve funkci pachytenního kontrolního bodu. Hybridi

Pro ověření hypotézy, zda gen *Fmr1nb* je totožným s genem *Hstx2* anebo genem odpovědným za plnění funkce pachytenního kontrolního bodu, byly samice zástupců delečních mutantních linií genu *Fmr1nb* kříženy s PWD samci, díky čemuž byli získáni hybridní (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1. Pokud by měl gen *Fmr1nb* funkci genu *Hstx2*, měli by zřejmě hybridní samci s delecí vykazovat změnu ve fenotypu meiotické profáze I oproti hybridním sourozencům bez delecce. Pokud by však gen *Fmr1nb* měl funkci kontrolního meiotického checkpoint proteinu, měli by hybridní (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 vykazovat obnovu fertilního fenotypu.

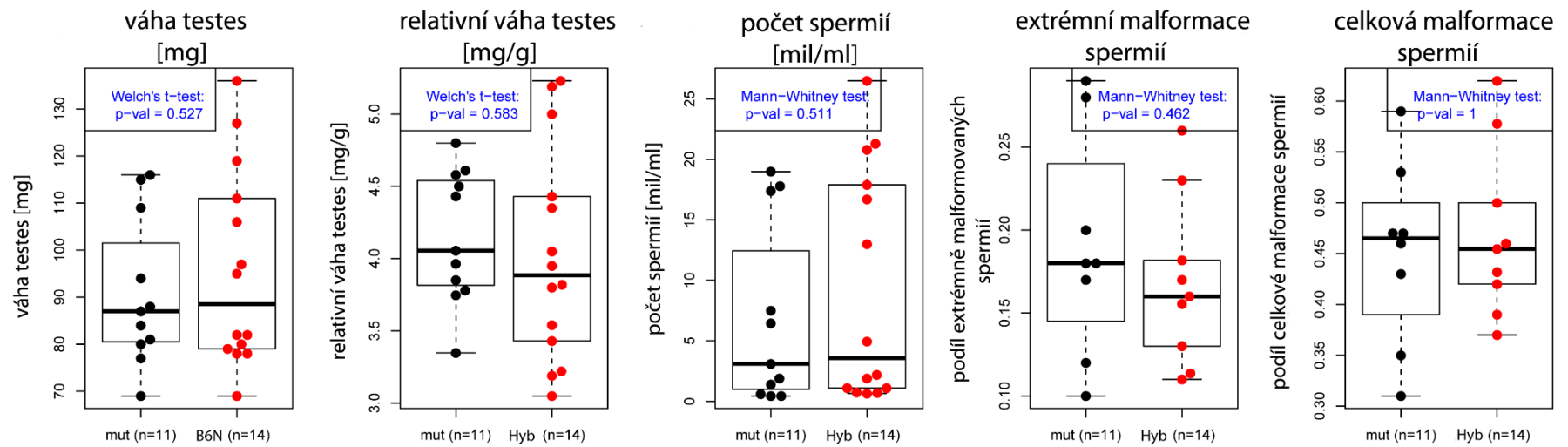
### 5.2.1 Parametry fertility u hybridních potomků (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 a kontrol (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1

U samců, u nichž byla potvrzena přítomnost delecce, byla provedena pitva a charakterizovány základní parametry fertility: váha těla, váha *testes*, relativní váha *testes* (váha *testes* vztažená k váze těla), počet spermií a morfologie spermií. Jako kontrola posloužila skupina hybridních sourozenců, jež nenesli delecí genu *Fmr1nb* (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1.

Pomocí statistických testů: Welchovým t-testem a Mann-Whitneyova testu, byly porovnány hodnoty hybridních samců všech dostupných delečních linií (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 (mut = Sub2AA,  $\Delta 23$ ,  $\Delta 37$  a  $\Delta 72$ ) se skupinou kontrolních hybridních samců, kteří delecí genu *Fmr1nb* nenesli (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1.

Z grafů 18. vyplývá, že mezi porovnávanými skupinami (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 a (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 nebyl v jednotlivých kategoriích parametrů fertility statisticky významný rozdíl. Pro váhu *testes* bylo  $P = 0,527$  (stanoveno Welchovým t – testem). Pro relativní váhu *testes* bylo  $P = 0,583$  (stanoveno Welchovým t – testem). Pro počet spermií  $P = 0,511$  (stanoveno Mann-Whitneyovým testem).  $P$  hodnota pro extrémní malformace spermií byla 0,462 (stanoveno Mann-Whitneyovým testem). Pro celkovou malformaci spermií je  $P = 1$  (stanoveno Mann-Whitneyovým testem).

Se statistickou analýzou pomáhal Mgr. Václav Gergelits.



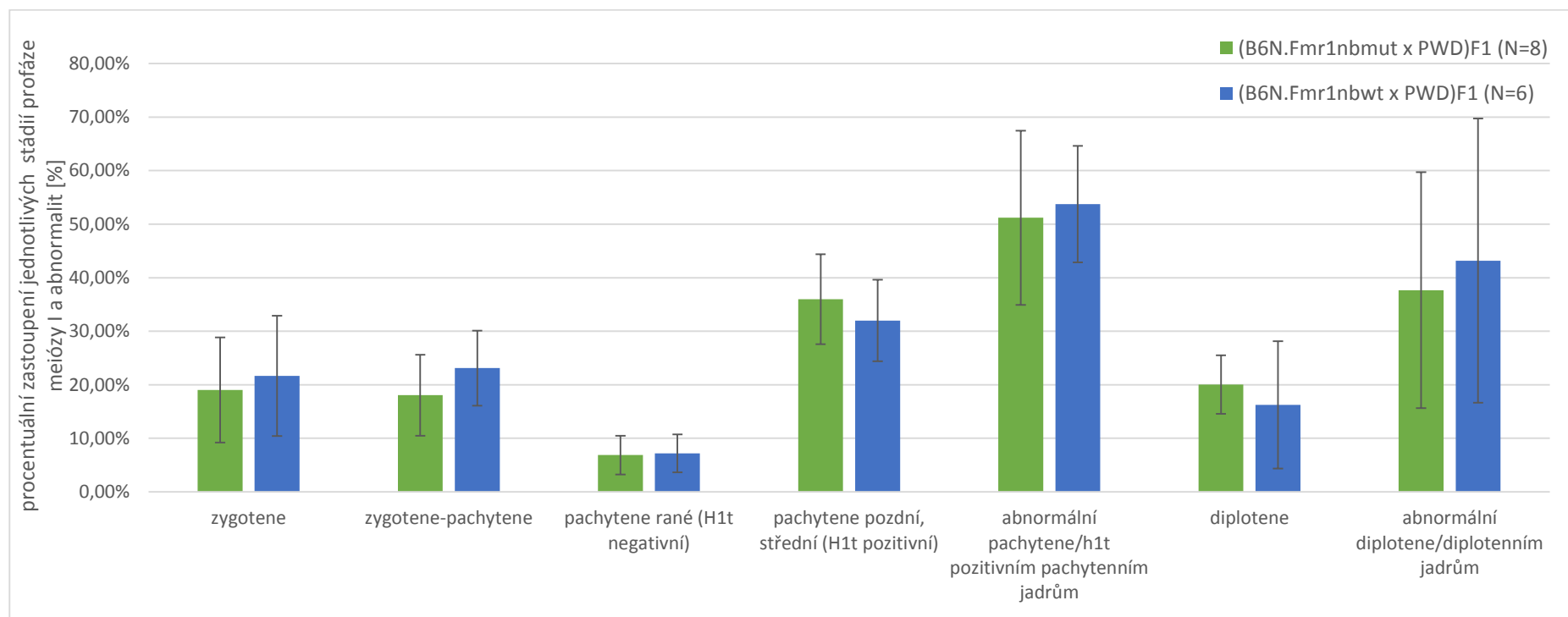
Graf 18.: Porovnání parametrů fertility hybridních samců delečních linií (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 a kontrolních hybridů (B6N x PWD)F1. Hodnoty jednotlivých parametrů skupiny hybridních samců delečních linií (mut, černé body) jsou vyneseny proti skupině kontrolních hybridů (Hyb, červené body). Počet jedinců použitých pro analýzu (n). P - hodnota – p – val je zanesena vždy v levém nebo pravém rohu grafu s použitým typem statistického testu

### 5.2.2 Imunocytoologie u hybridů

Hybridní samci s delecí v genu *Fmr1nb* (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 a jejich nemutantní sourozenci (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 byli usmrceni a podrobeni pitvě. Po stanovení základních parametrů fertility (viz předchozí kapitola 5.2.1 Parametry fertility u (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1) a (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1) bylo jedno *testis* použito k přípravě roztěrových meiotických preparátů. Analýza meiotické profáze I na těchto preparátech byla provedena pomocí imunofluorescenční mikroskopie s panelem protilátek proti specifickým meiotickým proteinům a to SYCP3,  $\gamma$ H2AX, H1t, HORMAD2 a CEN. Kombinace tří protilátek proti SYCP3,  $\gamma$ H2AX a H1 umožnila stanovit jednak relativní zastoupení vybraných stádií profáze I a stupeň asynapse. Rozsah asynapse homologních chromozomů byl analyzován pomocí protilátek proti: SYCP3, HORMAD2 a CEN.

Výsledky byly analyzovány pomocí základních statistických funkcí: aritmetický průměr a směrodatná odchylka a následně byly vyneseny do grafu za pomoci MS Excel.

V grafu 19. jsou porovnání hybridní samci (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 (mut = Sub2AA,  $\Delta$ 23,  $\Delta$ 37,  $\Delta$ 72) s jejich sourozenci, kteří mutaci genu *Fmr1nb* nenesli (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1. Z grafu 19. je patrné, že nedošlo k změně zastoupení stádií spermatocytů I mezi mutantními hybridy a kontrolními samci. Poměrné zastoupení abnormálních pachytenních spermatocytů u (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 bylo 51,2 %  $\pm$  16,26 % a nelišilo se významně oproti (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1, kdy poměr byl roven hodnotě 53,75 %  $\pm$  10,87 %. Poměr abnormálních diplotenních stádií ku celkovému počtu diplotenních stádií se signifikantně nelišil mezi (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 a (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 (poměr u mutantních hybridních potomků = 37,67 %  $\pm$  22,05 % a poté u kontrolních samců = 43,19 %  $\pm$  26,54 %).



Graf.19.: Zastoupení stádií samčí profáze meiózy I (od zygotenních do diplotenních spermatocytů) a zastoupení abnormalit v pachytenních a diplotenních jádrech u mutantních samců (*B6N.Fmr1nb<sup>mut</sup>* x PWD)F1 a jejich sourozenců bez delece (*B6N.Fmr1nb<sup>wt</sup>* x PWD)F1. Jako marker pro identifikaci raných a pozdních pachytenních jader posloužila protilátka proti testikulární histonové variantě H1, H1t, která se slabě objevuje od raného pachytene, případně od středního pachytene ve vyšším množství. Na ose X jsou vyobrazeny jednotlivá stadia profáze meiózy I (od zygotenních → po diplotenní spermatocyty). Abnormality jsou zobrazeny v pachytenních H1t pozitivních jádrech a diplotenních jádrech, Hodnota na ose Y představuje poměrné zastoupení stádií profáze meiózy I a abnormalit. Abnormality v H1t pozitivních pachytenních spermatocytech jsou vyhodnoceny ku celkovému počtu H1t pozitivních pachytenních jader. Abnormality v diplotenních stádiích jsou vyhodnoceny ku celkovému počtu diplotenních jader. N = počet jedinců. U (*B6N.Fmr1nb<sup>mut</sup>* x PWD)F1 (mut = Sub2AA, Δ23, Δ37 Δ72). N = počet jedinců.

### 5.2.3 Histologie testis mutantních hybridů s delecí v genu *Fmr1nb* a jejich nemutantních sourozenců.

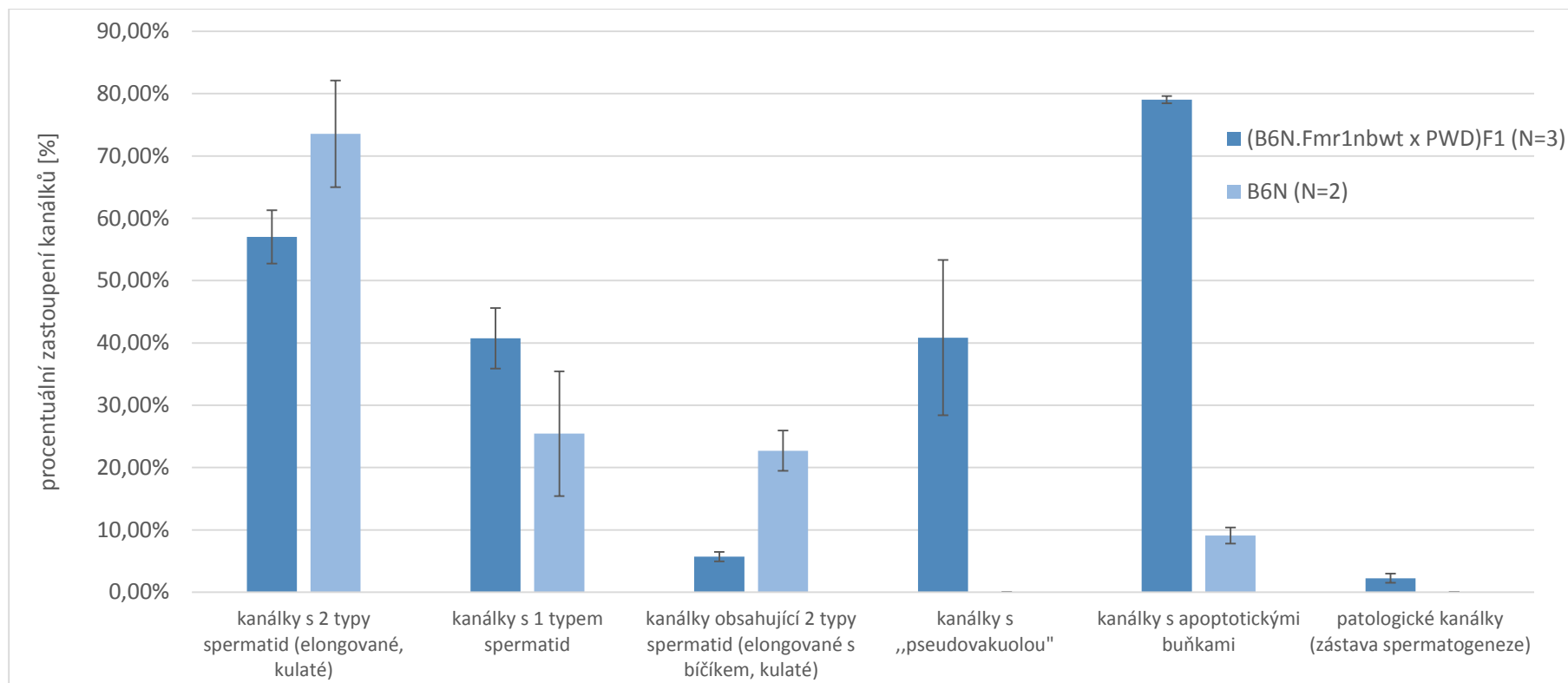
Jak u hybridních samců s delecí genu *Fmr1nb*, tak i u jejich nemutantních sourozenců (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F byla provedena pitva a změřeny nebo vypočítány základní parametry fertility a připraveny roztěrové preparáty (viz kapitola 5.2.2 Imunocytochemie hybridů). Druhé *testis* bylo zafixováno v Bouinu a posloužilo pro přípravu histologických řezů. Ty byly následně barveny standardním protokolem s hematoxylinem-eozinem. Pak byly pořízeny mikrofotografie histologických řezů a určeny kategorie kanálků podle zastoupení spermatogenních buněk: (A) *kanálek obsahující dva typy spermatid – elongované a kulaté*, (B) *kanálek s jedním typem spermatid*, (C) *kanálek s dvěma typy spermatid, přičemž elongované mají vyvinutý bičík* (viz obrázek 14. v kapitole 4.2.3.4 Histologické řezy *testes*). Patologické kanálky byly spojeny se zástavou spermatogeneze, přítomností kulatých prázdných míst tzv. „pseudovakuol“ a přítomností apoptotických buněk. Viz obrázek 18. kapitola 5.1.4.3 Histologie *testes* delečních linií B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> a kontrolních samců (B6N).

Data byla vyhodnocena pomocí základních statistických funkcí v programu MS Excel.: aritmetický průměr a směrodatná odchylka a vynesena do grafu 20. a 21.

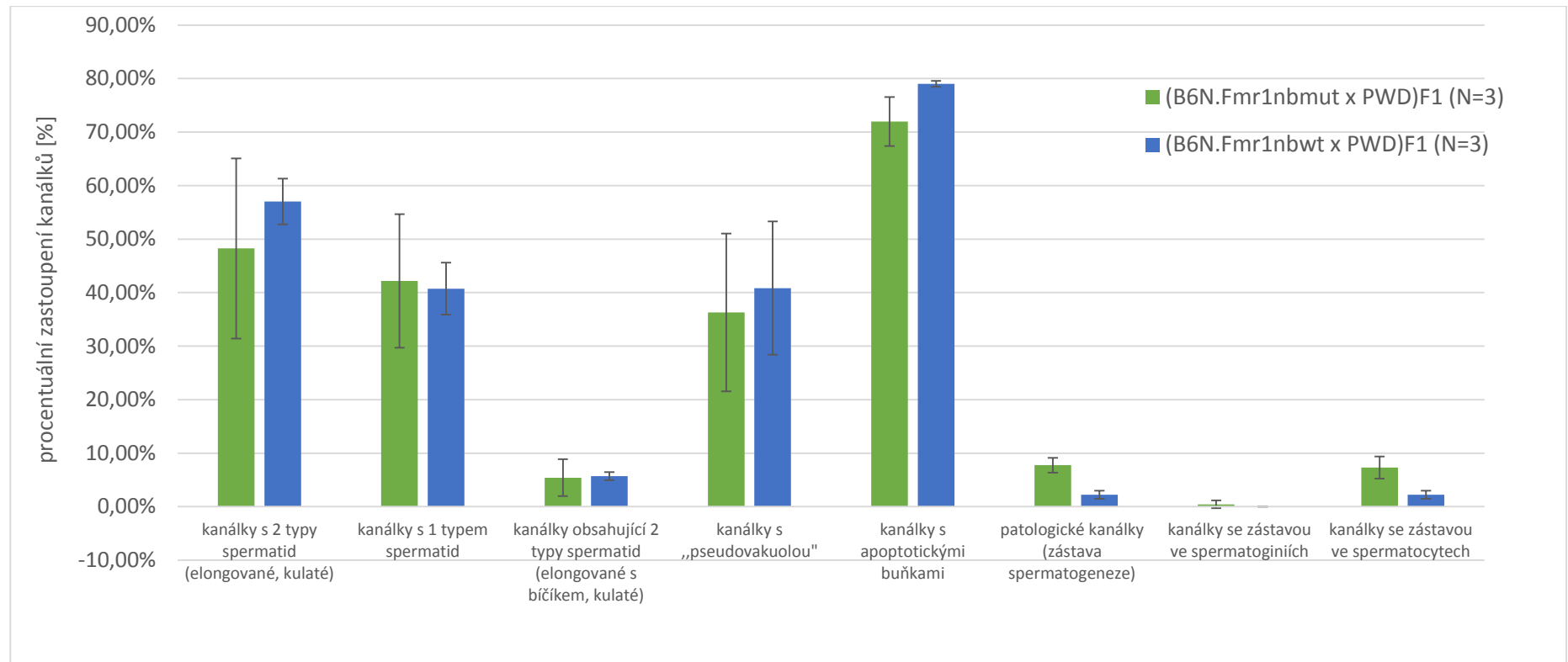
Hodnoty charakterizující spermiogenezi u hybridních nemutantních samců a samců čistého inbredního kmene B6N jsou vyneseny v grafu 20. Z porovnání je patrné, že u hybridních samců klesalo zastoupení kanálků obsahující dva typy spermatid (57,02 % ± 4,27 %) oproti samcům B6N, kde poměrné zastoupení kanálků s dvěma typy bylo 73,55% ± 8,55 %. Naopak byl pozorován nárůst počtu kanálků s jedním typem spermatid. U (B6N x PWD)F1 je poměr 40,74 % ± 4,87 % a u samců inbredního kmene B6N 25,43 % ± 9,99 %. U hybridních samců ubývalo i zastoupení kanálků obsahujících elongované spermatidy s bičíkem na hodnotu 5,73 % ± 0,73 % (u B6N byl počet kanálků s elongovanými spermatidami s bičíkem 22,7% ± 3,25 %). Tento rozdíl koreloval s nižším počtem spermií u hybridů oproti B6N. U hybridů narůstalo i poměrné zastoupení patologických kanálků a to převážně v kategoriích: kanálky obsahující „pseudovakuolu“ – potrhání lumen v důsledku apoptózy (40,85 % ± 12,46 %) a kanálky obsahující apoptotické buňky (79,03 % ± 0,57 %) (viz graf 20.).

V grafu 21. jsou porovnání mutantní hybridní samci (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 (mut = Sub2AA, Δ23, Δ72) s jejich sourozenci (nenesoucí mutaci). Mezi (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 a (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 nebyl vidět významný rozdíl v zastoupení jednotlivých kategoriích kanálků. V obou porovnávaných skupinách došlo

ke snížení počtu kanálků obsahujících dva typy spermatid (elongované a kulaté) a kanálků obsahujících dva typy spermatid, přičemž jeden typ byly elongované spermatidy s bičíkem. Pro (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 byly hodnoty 48,25 % ± 16,85 % a 5,43 % ± 3,45 %. Pro (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 byly hodnoty 57,02 % ± 4,27 % a 5,71 % ± 0,75 %. Naopak došlo srovnatelně u obou porovnávaných skupin k mírnému nárůstu počtu kanálků obsahujících jeden typ spermatid (pro (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 = 42,18 % ± 12,48 %; pro (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 = 40,74 % ± 4,87 %). V obou skupinách byly zastoupeny patologické kanálky ve všech 3 kategoriích: kanálky obsahující „pseudovakuolu“, kanálky obsahující apoptotické buňky a kanálky se zástavou buď ve spermatocytech, anebo ve spermatogoniích. Toto zastoupení se nelišilo mezi porovnávanými skupinami (viz graf 21.).



**Graf 20.: Spermatogeneze a spermiogeneze u (B6N.Fmr1nb<sup>wt</sup> x PWD)F1 a samců inbredního kmene B6N.** Na ose X jsou vyobrazeny jednotlivé kategorie: kanálky obsahující jeden typ spermatid (elongované, kulaté), kanálky obsahující jeden typ spermatid (elongované nebo kulaté), kanálky obsahující elongované spermatidy s bíčkem a kulaté spermatidy, kanálky obsahující tzv. „pseudovakuolu“ (potrhání lumen kanálku v důsledku proběhlé apoptózy), kanálky obsahující minimálně jednu apoptotickou buňku, patologické kanálky (vykazující zástavu spermatogeneze – posledním stadiem mohou být buď spermatogonie, anebo spermatocyty). Na ose Y je pak hodnota procentuálního zastoupení kategorií kanálků. **N** = počet jedinců.



Graf 21.: Spermatogeneze a spermiogeneze u hybridních samců s mutací v genu *Fmr1nb* (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 a u jejich nemutantních sourozenců (B6N. *Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1. Na ose X jsou vyobrazeny jednotlivé kategorie: kanálky obsahující jeden typ spermatid (elongované, kulaté), kanálky obsahující jeden typ spermatid (elongované nebo kulaté), kanálky obsahující elongované spermatidy s bičíkem a kulaté spermatidy, kanálky obsahující tzv. „pseudovakuolu“ (potrhání lumen kanálku v důsledku proběhlé apoptózy), kanálky obsahující minimálně jednu apoptotickou buňku, patologické kanálky (vykazující zástavu spermatogeneze – posledním stadiem mohou být buď spermatogonie, anebo spermatocyty). Na ose Y je hodnota procentuálního zastoupení kategorií kanálků. (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 (mut = Sub2AA, Δ23 a Δ72). N = počet jedinců.



## 6 Diskuze

### 6.1 Vliv delece genu *Fmr1nb* u B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> na spermatogenezi a spermiogenezi

Poddruhy myši domácí *Mus musculus domesticus* a *Mus musculus musculus* jsou blízcí příbuzní se společným předkem, který žil přibližně před pěti sty tisíci lety. Reprodukční izolace mezi těmito poddruhy je realizována postzygotickým mechanismem, kterým je samčí hybridní sterilita (HS). Raná stádia speciace jsou často provázena HS a to platí i pro *Mus m. domesticus* a *Mus m. musculus*, u nichž byla HS studována nejen u hybridů přirozených myších populací (MACHOLÁŇ *et al.* 2007, JANOUŠEK *et al.* 2012), ale i u hybridů laboratorních inbredních kmenů odvozených od těchto populací (například FOREJT 1996; MIHOLA *et al.* 2009, GOOD *et al.* 2010; OKA *et al.* 2004, DZUR-GEJDOSOVA *et al.* 2012, STORCHOVA *et al.* 2004). Náš model pro studium HS vychází z křížení inbredních kmenů PWD a B6, jejichž potomci, samci (PWD x B6)F1 jsou sterilní. Genetickým mapováním potomků zpětného křížení samic (B6J x PWD)F1 se samci B6J bylo určeno několik QTL na autozomech a jeden na chromozomu X, které jsou asociované s fenotypy samčí HS (DZUR-GEJDOSOVA *et al.* 2012). Interakce lokusu na chromozomu X<sup>PWD</sup> s heterozygotním lokusem na chromozomu 17<sup>PWD/B6</sup>, jenž je shodný s *Prdm9*, je zcela nezbytná pro manifestaci sterilního fenotypu u mezidruhových kříženců (TURNER *et al.* 2014). Doposud ale nebyla určena identita odpovědného genu na X-vázaném lokusu. Cílem této práce bylo určit, zda jeden z genů nacházejících se na tomto lokusu, *Fmr1nb*, je odpovědný za fenotyp popsáný pro *Hstx1* nebo *Hstx2*.

Na základě dříve publikované studie bylo určeno sedm kandidátních genů *Hstx1* a *Hstx2* v úseku dlouhém 4,7 Mb (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Tento lokus se překrýval s 8,4 Mb dlouhým QTL, zodpovědným za sterilitu samců vzniklých přenosem chromozomu X z PWK/Ph (dále již PWK, inbrední kmen odvozen z *Mus m. musculus*) do genetického pozadí *Mus m. domesticus* (reprezentován laboratorním kmenem LEWES).

Gen *Aff2* vykazuje expresní maximum desátý den po narození, v časově shodné fázi s velice ranou profází meiózy I a v kódující oblasti obsahuje pět SNP, jimiž se odlišují kmeny B6J a PWD. Tento gen zasahuje do kandidátní oblasti (4,7 Mb dlouhého úseku na chromozomu X) pouze jeho 5' koncem. Geny *Slitrk2*, *Ctag2*, *4933436I01Rik* a *4930447F04Rik* jsou exprimovány postmeioticky a tudíž nejsou kandidátními geny pro *Hstx2* (BHATTACHARYA *et al.* 2014, MARGOLIN *et al.* 2014). Gen *Fmr1* je z kandidátních genů nejprobádanější a dnes se již ví, že nepřítomnost transkriptů, a tudíž i proteinu je asociována

s výskytem mentální retardace - syndromem fragilního X (VERKERK *et al.* 1991). Tento gen však nesplňuje jednu z podmínek pro kandidátní gen, neobsahuje totiž žádný polymorfismus (B6J/PWD) (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Předpokladem D-M modelu je interakce mezi alelickými variantami, tudíž gen *Fmr1* nesplňuje toto kritérium (DOBZHANSKY 1937; MULLER 1940).

Za zcela nejvýznamnějšího kandidáta byl shledán gen *Fmr1nb*, jehož testikulární expresní profil vykazuje maximum ve čtrnáctém dnu po narození, kdy již pozorujeme u juvenilních samců výskyt první vlny pachytenních spermatocytů (MARGOLIN *et al.* 2014). Lokus *Hstx2<sup>PWD</sup>* totiž způsobuje zástavu spermatogeneze právě v pachytene (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Gen *Fmr1nb* byl také určen jako jeden z devíti možných kandidátních genů HS na základě analýzy QTL - váhy *testes*, počtu spermií a morfologie spermií u kříženců dvou myších podruhů - LEWES a PWK (GOOD *et al.* 2008b). Na základě porovnání fertilních samců se sterilními hybridy (PWK x LEWES)F1 bylo identifikováno celkově 42 genů, jejichž exprese se lišila mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$  stanoveno Welchovým t-testem). Přičemž jedním z identifikovaných genů na chromozomu X byl i gen *Fmr1nb*. Všechny tyto studie silně podporují naši hypotézu, že gen *Fmr1nb* je nejvhodnějším kandidátem pro gen hybridní sterility na X chromozomu.

Počítačová analýza struktury (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) předpověděla, že kandidátní protein pro *Hstx1/Hstx2* FMR1NB je za fyziologických podmínek ukotven na cytoplazmatické membráně pomocí dvou transmembránových domén s N-koncem a C-koncem proteinu umístěnými intracelulárně (membránová lokalizace byla potvrzena také *in vitro* pokusem Dr. S. Kinským, nepublikovaná data). Podobně Luetkens a kolegové prokázali, že protein je transmembránový (LUETKENS *et al.* 2010). Naopak PRDM9 je lokalizován v buněčném jádře a určuje lokalizaci rekombinačních hotspotů (GREY *et al.* 2011). Nicméně lze spekulovat, že přechodná interakce čerstvě translatovaného PRDM9, nacházejícího se v cytoplasmě, s jednou z intracelulárních domén FMR1NB by mohla způsobit určitou posttranslační modifikaci důležitou pro funkci PRDM9. Interakce jaderných proteinů s proteiny plazmatické membrány byly popsány například ve studiích Schwikowski a kolegové (2000) nebo Giot a kolegové (2003). Další možností je, že interakce FMR1NB s PRDM9 je u hybridů heterospecifická (PWD/B6) a tato interakce by mohla působit „toxicky“ na funkci PRDM9. Taková interakce by vznikla jen mezi FMR1NB<sup>PWD</sup> a PRDM9<sup>B6</sup> a ne v opačné kombinaci alelických produktů. Doposud nebylo testováno, jak by transmembránový protein FMR1NB mohl specificky interagovat s PRDM9.

Pomocí genetické manipulace využívající sekvenčně specifických TALE-nukleáz, byly připraveny deleční mutanty genu *Fmr1nb* za účelem objasnění jeho molekulární funkce v meióze či spermatogenezi (obrázek 15.). DNA vazebná doména TALE-nukleáz byla navržena komplementárně k oblasti start kodonu ATG v prvním exonu genu *Fmr1nb* s cílem odstranit tento translační start. Cílem bylo získat nulové mutanty genu *Fmr1nb* s předpokladem, že by mohly mít podobný fenotyp jako nulová mutace genu *Prdm9*<sup>-/-</sup>, která sama o sobě způsobila zástavu spermatogeneze a oogeneze, distorzi XY tělíska a sterilitu (BAUDAT *et al.* 2010; HAYASHI *et al.* 2005; PARVANOV *et al.* 2010; BIRTLE a PONTING 2006). Očekávali jsme, že pokud i gen *Fmr1nb* hraje roli v hybridní sterilitě, jeho funkce by měla být úzce spjata s meiózou.

Kromě nulové mutanty B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup> byly připraveny i mutanty, jenž vedly ke vzniku potenciálního alternativního start kodonu ATG (B6N.*Fmr1nb*<sup>2AASub</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>). Aby alternativní start kodon ATG mohl být využit jako translační start, musí být nejen ve správném sekvenčním kontextu (Kozakova sekvence) (KOZAK 1987), ale i ve správné vzdálenosti od 5' konce genu (ZUR a TULLER 2013). V případě B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup> se na základě již dříve uvedeného predikčního programu transmembranových helixů ukázalo, že zkrácení proteinu o 23 AMK nemělo vliv na jeho transmembránovou strukturu. Ani v případě B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup>, kdy byl protein po deleci a substituci dlouhý 238 AMK, nebyla počítačová predikce transmembranových domén odlišná od normálního proteinu. Lze tedy uvažovat, že pokud budou vznikat tyto dvě varianty proteinu FMR1NB, bude vyměněna nebo ztracena jen funkce spojená s N-terminální doménou a zbytek proteinu může být normálně funkční. Pokud by ale na N-terminální doméně proteinu byla umístěna signální sekvence, pak protein by nebyl lokalizován v jeho nativním prostředí (plazmatické membráně). Ačkoliv by tedy mohl být syntetizován, nenacházel by se ve správném buněčném kompartmentu a nemohl by tak plnit svou funkci. Lze tak očekávat, že i tyto dvou deleční varianty budou mít stejný fenotyp jako zbylé mutanty.

Množství mRNA genu *Fmr1nb* bylo stanoveno relativně vzhledem ke konstitutivně exprimovanému genu *β-Aktin* pomocí RT-real time qPCR na celkové testikulární RNA. Na základě této analýzy bylo potvrzeno, že B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup> je skutečně nulovou mutantou, neboť nebyla odhalena přítomnost mRNA genu *Fmr1nb*, tudíž nemohl vznikat ani protein. U zbylých B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> byl transkript stále přítomen. U nemutovaného genu *Fmr1nb* jsou přítomny ve čtecím rámci další kodony ATG. Pokud by potenciální alternativní start kodon ATG byl ve správném sekvenčním kontextu, stále by mohla vznikat zkrácená varianta proteinu. Fenotyp

nulové mutanty byl totožný s fenotypy ostatních variant B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup>. To lze vysvětlit tím, že pro funkci FMR1NB je buď zcela zásadní její N-terminální doména a jejím zkrácením nebo změněním je protein nefunkční, anebo protein u žádné z mutantních variant *Fmr1nb*<sup>mut</sup> nevzniká ani ve zkrácené formě. Tato hypotéza je podpořena zjištěním, že ačkoliv jsou ve směru transkripce i proti směru transkripce přítomny kodony ATG, tak nukleotidové okolí snižuje pravděpodobnost jejich využití jako potenciálních start kodonů (ZUR a TULLER 2013). Třetí možnou hypotézou, kterou jsem nastínila v předchozím odstavci je, že pokud vznikl protein, přišel o N terminální signální sekvenci, která určovala jeho umístění do plazmatické membrány. Ačkoliv by mohl vznikat, nebyl by ve správném buněčném prostředí. Ověření přítomnosti proteinu FMR1NB u delečních linií jsem nemohla provést, protože se jednalo o N-terminální deleční mutanty a jediná komerčně dostupná protilátka je namířena proti epitopům na N-terminální doméně, tudíž by s největší pravděpodobností nebyla u mutantů funkční (FMR1NB (S-15): sc-246953, výrobce: Santa Cruz biotechnology). Nezávisle byl předpoklad o nefunkčnosti protilátky potvrzen Dr. Slavem Kinským.

#### **6.1.1 Charakterizace fenotypu u delečních linií genu *Fmr1nb* a kontrol.**

U samců šesti myších delečních linií genu *Fmr1nb* (B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ102</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ237</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup>) byly stanoveny vybrané fenotypy charakterizující stav fertility/sterility samců a průběhu spermatogeneze. Analyzovány byly následující parametry fertility: váha *testes*, relativní váha *testes*, počet spermií, morfologie spermií. Průběh profáze meiózy I byl posouzen pomocí imunobarvení klíčových markerů spermatogeneze. Pro získání detailnějšího vhledu do průběhu meiózy jsem provedla i detailní analýzu semenotvorných kanálků na histologických řezech (na řezech barvených eosin-hematoxylin i na řezech fluorescenčně značených metodou TUNEL).

Porovnáním jednotlivých parametrů fertility dvou skupin samců, a to samců všech delečních linií B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> se samci inbredního kmene B6N, byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl pouze mezi mediány hodnot relativní váhy *testes*, extrémní malformace spermií a celkové malformace spermií (P<5%, stanoveno buď Welchovým t-testem, anebo Mann-Whitneyovým testem). Statistická významnost rozdílů jednotlivých parametrů fertility byla dále testována v podskupinách rozřazených podle věku do dvou kategorií 8-13 týdnů a starší než 14 týdnů. Statisticky významný rozdíl hodnot relativní váhy *testes* mezi oběma porovnávanými skupinami v tomto případě nebyl již pozorován. Výše uvedený statisticky významný rozdíl relativní váhy *testes* mezi všemi delečními mutantami B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup>

a skupinou všech kontrol B6N tedy musel být zatížen velkými rozdíly v absolutní váze těla testovaných samců odlišného věku a nemá tedy biologicky vypovídající hodnotu.

Na pozorovaný fenotyp strukturních abnormalit spermií u delečních mutantů neměl vliv ani věk analyzovaných myší, ani zda delece způsobila vznik potenciálního alternativního start kodonu ATG či nikoliv. To by znamenalo, že ačkoliv byly analyzovány různé deleční varianty, jejich vliv na fenotyp byl stejný a připomínal fenotyp *Hstx1* popsáný dříve (STORCHOVA *et al.* 2004). To by mohlo znamenat, že za funkci proteinu FMR1NB vyjádřenou fenotypem *Hstx1* je odpovědná N-terminální doména, anebo je N konec nezbytný pro signalizaci do membrány. Pokud totiž vzniká protein u mutantních samců B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup> a B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup>, tak jeho N-terminální doména je modifikována buď jejím zkrácením, anebo záměnou dvou aminokyselin, což může mít vliv na funkci daného proteinu, ale i na jeho lokalizaci.

Oka a kolegové identifikovali lokus *Sha2*, který zodpovídal za defektní spermatogenezi při přenosu chromozomu X z *Mus m. molossinus* (laboratorní kmen MSM/MS) do B6J. *Mus m. molossinus* je potomek vzniklý z křížení mezi *Mus. m. castaneus* a *Mus m. musculus*). Tento HS QTL je mapován do stejné oblasti jako *Hstx1* (OKA *et al.* 2004), a tudíž podporuje naši hypotézu o X vázaném lokusu zodpovídající za morfologické abnormality spermií. Storchová a kolegové analyzovali konzomický kmen - B6J-X<sup>PWD</sup> Y<sup>B6</sup>, který nesl celý chromozom X z inbredního kmene PWD a pozorovali výrazné navýšení počtu spermií s abnormální morfologií (84,9 % spermií). Spermie byly klasifikovány do tří kategorií podle své morfologie: kratší háček a redukce distální části hlavičky – 58,7 %, vejířkovitý nebo kosočtvercový tvar hlavičky – 24,1 %, jiné abnormality 2,1 %. Pouze 13,7 % spermií vykazovalo normální morfologii. (STORCHOVA *et al.* 2004). Oka a kolegové vytvořili pro identifikaci abnormalit v morfologii spermií šest kategorií (krátký háček, úzká hlavička, úzká hlavička v kombinaci se zkráceným háčkem, čtvercový tvar hlavičky s krátkým háčkem, čtvercový tvar hlavičky a ztráta háčku, kulatá malá hlavička). Při přenosu X chromozomu z *Mus m. molossinus* na B6J pozadí došlo k nárůstu počtu abnormálních spermií ze 4., 5. a 6. kategorie, přičemž ve 4. byla lokalizována naprostá většina abnormálních spermií (71 %). Pro jednoduchost a pozdější snadnější reprodukovatelnost jsem zavedla pouze 3 kategorie: abnormální tvar hlavičky, bičík špatně nasedající na hlavičku a abnormality háčku. Ve srovnání s mými daty u B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> 33 % ± 7,66 % spermií vykazovalo morfologické abnormality. Bhattacharya a kolegové se zaměřili na tento fenotyp u parciálních konzomických kmenů - B6J.PWD-Chr X.1, B6J.PWD-Chr X.1s, B6J.PWD-Chr X.2 a B6J.PWD-Chr X.3. Ty se od sebe lišily délkou

a umístěním úseku  $X^{PWD}$  na B6J pozadí. B6J.PWD-Chr X.1 nesl proximální část  $X^{PWD}$ . B6J.PWD-Chr X.1s se oproti předcházejícímu kmenu lišil úsekem dlouhým 4,7 Mb, do kterého byl následně lokalizován také lokus *Hstx2* odpovídající za zástavu spermatogeneze. B6J.PWD-Chr X.2 nesl mediální část chromozomu  $X^{PWD}$  a B6J.PWD-Chr X.3 nesl distální část chromozomu X z kmene PWD. Na základě rozdílu ve fenotypu mezi jednotlivými konzomickými kmeny byl určen lokus *Hstx1* do úseku dlouhého 4,7 Mb, jímž se od sebe liší B6J.PWD-Chr X.1 a B6J.PWD-Chr X.1s. Kmen B6J.PWD-Chr X.2, který nesl ve svém genotypu také *Hstx1*<sup>PWD</sup>, vykazoval nižší zastoupení spermií s abnormální morfologií ( $24,3 \% \pm 6,4 \%$ ) oproti kmenu B6J-PWD-Chr X.1s ( $62,3 \% \pm 3,6 \%$ ). Na základě rozdílu mezi těmito dvěma kmeny byl vytvořen závěr, že musí být ještě jeden lokus v proximální části chromozomu X, který přispívá k abnormálnímu fenotypu (BHATTACHARYA *et al.* 2014). I v dalších studiích potvrdili existenci dalších lokusů nezbytných pro úplný projev abnormální morfologie spermií (OKA *et al.* 2004, GOOD *et al.* 2008b). Good a kolegové identifikovali, že za abnormální morfologii při přenosu  $X^{PWK}$  na pozadí inbredního kmene LEWES, mohl převážně lokus lokalizovaný proximálně na chromozomu  $X^{PWK}$  v pozici 20 cM. Ačkoliv i lokusy z centrální části obsahovaly QTL pro abnormální morfologii, nebyly tyto lokusy natolik významné (GOOD *et al.* 2008b). Tato studie podporuje můj závěr, že *Fmr1nb* by skutečně mohl být jedním z faktorů přispívajících k abnormální morfologii spermií.

Rozdíl mezi kmeny B6J.PWD-Chr X.1s a B6J.PWD-Chr X.2 není v mých datech tak jednoznačně patrný (u B6J.PWD-Chr X.2 celkový počet abnormálních spermií byl  $54 \% \pm 13 \%$ , u B6J.PWD-Chr X.1s byl celkový počet abnormálních spermií  $54 \% \pm 6 \%$ ). Důvodem rozporu se studií Bhattacharya a kolegů (2014) může být, že jsem měla k dispozici pouze málo testovaných zvířat (počet jedinců v případě B6J.PWD-Chr X.1s = 2 a v případě B6J-PWD-Chr X.2 = 2). Rozdíl by se zřejmě mohl projevit až při větším počtu zvířat.

Pokud by gen *Fmr1nb* hrál roli ve spermiogenezi, pak by delece genu *Fmr1nb* měla vést k projevu abnormální morfologie spermií. Pokud spermie budou vykazovat odlišnou morfologii, pak by mohla být ovlivněna jejich schopnost vazby na obal vajíčka, a tudíž by nemuselo dojít k průniku spermie do oocyty a nebylo by možné oplození. Mohl by to tak být faktor přispívající k reprodukční izolaci dvou druhů. Nicméně podíl normálních spermií je stále velmi vysoký a fertilita samců mutantních linií je v podstatě normální. Současně však nefunkčnost FMR1NB není dostačující k manifestaci sterility samců, neboť deleční mutanti jsou stále plodní, tudíž je nejspíš potřeba ještě dalšího *Hstx* lokusu na chromozomu X pro vyjádření plného abnormálního fenotypu *Hstx1*.

Průběh profáze meiózy I nebyl významně narušen u delečních mutantů B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> oproti kontrolám B6N. Profáze byla analyzována převážně pomocí imunoznačení tří specifických meiotických proteinů – SYCP3 (součástí synaptonemálního komplexu, jenž pojí k sobě dva homologní chromozomy), H1t (testikulární varianta histonu H1, která nahrazuje H1 v období mezi raným a středním pachytene a je to tak unikátní marker pro rozlišení jednotlivých pachytenních substádií) a  $\gamma$ H2AX (fosforylovaná varianta H2A, jež je v raných meiotických stádiích asociována s místy dvouvláknových zlomů DNA a v pozdějších stádiích s pohlavním tělískem). Na základě imunobarvení těchto tří markerů byly spermatogenní buňky rozřazeny do jednotlivých stádií a substádií a byly určeny abnormality v pachytenních a diplotenních jádrech. Ačkoliv jsem u B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> pozorovala mírný nárůst patologických jader (4,67 %  $\pm$  6,64 %, 6,95 %  $\pm$  6,25 %), nestačily tyto patologie, aby negativně ovlivnily fertilitu těchto samců a samci byli stále plodní. Bhattacharya a kolegové, kteří porovnávali počet abnormalit v pachytenních stádiích mezi (B6J.PWD-Chr X.1s PWD)F1 a (PWD a B6J)F1, dospěli k závěru, že v důsledku přítomnosti lokusu *Hstx2*<sup>PWD</sup> došlo k výraznému ovlivnění průběhu meiózy a k zástavě spermatogeneze v pachytene a počet pozorovaných abnormalit byl srovnatelný s počtem, který byl pozorován u (PWD x B6J)F1 (téměř 90 % jader s asynapsovanými chromozomy). Zde prezentované výsledky neprokázaly totožnost genu *Fmr1nb* s genem *Hstx2*, jenž způsobuje zástavu spermatogeneze v pachytene a přispívá tak k reprodukčnímu oddělení dvou poddruhů. Je třeba si uvědomit, že v této práci byly použity deleční mutanty alely B6N genu *Fmr1nb*. Definitivním ověřením, nebo vyloučením identity genu *Fmr1nb* s *Hstx2* by měla přinést příprava hybridního samce obsahující hybridní autozomální genetické pozadí PWD/B6 (tudiž i heterozygotní *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup>) a alelu genu *Fmr1nb*<sup>PWD</sup>. Za tímto účelem jsou připravováni deleční mutanti genu *Fmr1nb* s použitím subkonsomického kmene B6J.PWD-Chr X.1s (GREGOROVÁ *et al.* 2008) a to pomocí technologie sekvenčně specifických TALE-nukleáz. Samice B6J.PWD-Chr X.1s*Fmr1nb*<sup>mut</sup> pak budou kříženy se samci PWD. U hybridních samců budou analyzovány základní parametry fertility a průběh profáze meiózy I. Pokud je gen *Fmr1nb* identický s *Hstx2*, tak nulová delece *Fmr1nb*<sup>PWD</sup> bude mít za následek, že *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> ztratí interakčního partnera nezbytného pro fenotyp HS a tudíž by samci měli být fertilní.

Další potenciální testovanou hypotézou bylo, zda by gen *Fmr1nb* mohl plnit roli v meiotické homologní rekombinaci. Abychom mohli dát odpověď na tuto otázku, bylo určováno u vybraných zástupců delečních linií genu *Fmr1nb* počet crossing-overů (CO) pomocí imunofluorescenčního značení rekombinačních nodulů pomocí protilátky proti MLH1, která slouží jako marker CO. Ačkoliv u B6N.*Fmr1nb*<sup>A367</sup> došlo k mírnému snížení průměrného

počtu pozitivních bodů MLH1 na pachytenní spermatocyt ( $23,8 \pm 0,72$ ), ale zbylé deleční linie B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ102</sup> toto snížení nevykazovaly (pro B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup> byl průměrný počet pozitivních bodů MLH1 na spermatocyt (Sc) byl  $24,5 \pm 1,6$ ; poté u B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>  $24,3 \pm 0,7$  a obdobně i u B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ102</sup>:  $25,2 \pm 2$ ), lze říct, že delece neměly zásadní vliv na fenotyp frekvence meiotické homologní rekombinace, a proto musíme tuto hypotézu zamítnout. Průměrný počet pozitivních bodů MLH1 na pachytenní Sc je u B6N  $24,4 \pm 0,24$ . Tyto výsledky souhlasí s dříve naměřenými daty Bhattacharya a kolegů (BHATTACHARYA *et al.* 2013).

Inbrední kmen B6N sám o sobě vykazoval vyšší biologickou variabilitu i mezi sourozenci ve váze *testes* (průměrná váha *testes* [mg]:  $188,73 \pm 22,45$ ) a počtu spermií (průměrný počet spermií [mil/ml]:  $77,84 \pm 23,4$ ) nežli kmen B6J (váha *testes* [mg]:  $188 \pm 21$ ; počet spermií [mil/ml]:  $28,5 \pm 3,2$ ) (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Má práce tak přispěla i ke zdokumentování fenotypových rozdílů těchto dvou kmenů, které se od sebe lišili pouze 34 SNP v kódující oblasti (SIMON *et al.* 2013). Díky tomu, že samci B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> vykazovali podobnou variabilitu ve váze *testes* a počtu spermií (průměrná váha *testes* [mg]:  $183,71 \pm 31,02$  a průměrný počet spermií [mil/ml]:  $71,84 \pm 24,75$ ) jako samci čistého inbredního kmene B6N, nelze jí připisovat biologický význam.

Kvalita a kvantita spermatogeneze a spermiogeneze byla analyzována na histologických řezech barvených pomocí eosinu-hematoxylinu. Rozsah apoptózy byl analyzován na fluorescenčně značených řezech metodou TUNEL. Nižší váha *testes* a počet spermií u samců korelovaly i s vyšším zastoupením kanálků obsahujících minimálně jednu apoptotickou buňku. Vyšší poměr kanálků s apoptotickou buňkou vykazovala i deleční linie B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ367</sup>, která je jako jediná definitivně potvrzena jako nulová mutanta na základě RT-real time qPCR. Toto navýšení je podpořeno i vyšším výskytem morfologicky abnormálních spermií ( $33 \% \pm 11 \%$ ) u této deleční mutanty.

Jeden ze dvou samců deleční linie B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup> (ID 31462) vykazoval i kanálky se zástavou spermatogeneze. Navíc při analýze spermatogeneze vykazoval tento samec vysoký počet spermií (133 mil/ml), ale téměř všechny spermie měly od sebe disociovanou hlavičku a bičík, tato disociace byla pak také patrná na histologických řezech. Tento samec byl sterilní. Oproti tomu druhý samec se stejnou mutací tyto abnormality nevykazoval, a tudíž nelze dokázat, že pozorovaný fenotyp byl v důsledku mutace genu *Fmr1nb*. *Epididymis* samce (ID:31462) navíc vykazovalo abnormální velikost a je pravděpodobné, že vývodní cesty



semene byly neprůchozí, a tudíž došlo pod tlakem k oddělení hlaviček od bičků. Fenotyp tak bude spíše dán v důsledku morfologické abnormality *epididymis*

Na základě zde prezentovaných naměřených dat lze konstatovat, že gen *Fmr1nb* hraje roli ve spermiogenezi a mohl by být shodný s *Hstx1*. Jaký je molekulární mechanismus tohoto jevu a zda skutečně je faktorem přispívajícím k reprodukční izolaci dvou druhů, je předmětem dalšího studia.

## 6.2 Vliv delece genu *Fmr1nb* u (B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 na spermatogenezi a spermiogenezi.

Pomocí analýzy QTL parametrů fertility (váhy *testes* a počtu spermií) u hybridních samců, kteří vznikli křížením samic parciálních konzomických kmenů B6J.PWD-Chr X.# se samci PWD byl na chromozomu X do oblasti dlouhé 4,7 Mb lokalizován gen *Hstx2* (touto oblastí se od sebe liší B6J.PWD-Chr X.1 a B6J.PWD-Chr X.1s). *Hstx2*<sup>PWD</sup> způsobuje u hybridů zástavu spermatogeneze (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Pro ověření identity genu *Fmr1nb* s genem *Hstx2* anebo genem odpovědným za plnění funkce pachytenního kontrolního bodu, byly samice zástupců delečních variant genu *Fmr1nb* (B6N.*Fmr1nb*<sup>Sub2AA</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ23</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ37</sup>, B6N.*Fmr1nb*<sup>Δ72</sup>) kříženy s PWD samci. Důvodem uspořádání tohoto směru křížení je, že jsme měli deleční mutanty X-vázaného genu *Fmr1nb* na pozadí B6N a potřebovali jsme přenést deleci na hybridní pozadí.

Pokud by měl gen *Fmr1nb* plnit funkci genu *Hstx2*, chyběl by pak interakční partner *Prdm9*<sup>B6N/PWD</sup>, což by se mělo projevit na fenotypu hybridů pozitivním směrem (vyšší váha *testes*, počet spermií, redukce abnormalit ve spermatocytech). Podobně uvažovali i ve své studii Flachs a kolegové, kteří analyzovali mimo jiné i hybridní samce (PWD x B6J.*Prdm9*<sup>-/-</sup>)F1 a (B6J.*Prdm9*<sup>-/-</sup> x PWD)F1.

Samci prvního křížení vykazovali semifertilní fenotyp (detekce spermií v *epididymis* - 0,06 mil/ml; váha *testes*: 82 mg; produkce potomků) oproti sourozencům, kteří nenesli deleci (žádné spermie v *epididymis*, váha *testes*: 59 mg, bez potomků. Rozdíl vyšel v obou skupinách statisticky signifikantně s  $P < 0,01$ . Druhý typ křížení ukázal, že hybridi (PWD x B6J)F1 jsou více závislí na dávce *Prdm9*, neboť u samců (B6J.*Prdm9*<sup>-/-</sup> x PWD)F1 byla jedna kopie *Prdm9*<sup>PWD</sup> dostatečná pro udržení fertilních parametrů. Samci vykazovali signifikantně vyšší váhu *testes* (174 mg) a počet spermií (4,1 mil/ml) oproti jejich nemutantním sourozencům ( $P < 0,002$ ) (FLACHS *et al.* 2012).

Gen *Fmr1nb* by také mohl plnit roli kontrolního meiotického proteinu, který reaguje na přítomnost patologií zástavou nebo zpožděním spermatogeneze. V případě jeho vyřazení či nefunkčnosti by pak mělo dojít k uvolnění zástavy v pachytenním stádiu, a tudíž k nárůstu počtu buněk v diplotenních stádiích.

Za účelem ověření identity *Fmr1nb* s *Hstx2*, popřípadě s meiotickým kontrolním proteinem, byli hybridní samci (B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 analyzováni na parametry fertility (váha *testes*, relativní váha *testes*, počet spermií a morfologie spermií) a průběh profáze meiózy I pomocí imunoznačení tří specifických meiotických proteinů – SYCP3, H1t a  $\gamma$ H2AX. Toto značení nám umožňuje kromě určení patologií i rozřazení pachytenních stádií do tří substádií: rané, střední a pozdní. Analýza spermatogeneze byla provedena také na histologických řezech barvených eosin-hematoxylinem.

Na základě porovnání jednotlivých parametrů fertility pomocí statistických testů (Welchovým t-testem, anebo Mann-Whitneyovým testem) dvou skupin, a to hybridních samců vybraných delečních linií genu *Fmr1nb* (Sub2AA,  $\Delta$ 23,  $\Delta$ 37 a  $\Delta$ 72) s nemutantními hybridními sourozenci, nebyl pozorován rozdíl mezi těmito dvěma skupinami ( $P > 5\%$ ). Průměrná váha *testes* u (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 byla  $90,91 \pm 15,84$  mg a počet spermií  $6,91 \pm 7,54$  mil/ml. Ačkoliv tato data vykazovala velký rozptyl, stejnou tendenci vykazovala data i u (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 (průměrná váha *testes* –  $95,64 \pm 20,23$  mg a počet spermií  $9,25 \pm 9,24$ ), a tudíž jim nelze přikládat biologický význam. V porovnání (B6J x PWD)F1 vykazovali vyšší váhu *testes* ( $113 \pm 8$  mg) a počet spermií ( $13,7 \pm 4,3$  mil/ml) (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Důvodem těchto rozdílů bylo, že jsem pro analýzu měla dostupné jednak mladší samce (8-9 týdnů) a poté starší samce (13 týdnů). Po rozřazení do věkových podkategorií již rozptyl dat nebyl patrný. U mladších samců (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 byla průměrná váha *testes*  $82,5 \pm 7,62$  mg a průměrný počet spermií  $2,73 \pm 2,78$  mil/ml. U stejně starých nemutantních sourozenců (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 byla průměrná váha *testes*  $82,22 \pm 8,22$  mg a průměrný počet spermií  $2,93 \pm 3,78$  mil/ml. U starších samců (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 byla průměrná váha *testes*  $113,33 \pm 3,79$  mg a počet spermií  $18,07 \pm ,83$  mil/ml. U stejně starých sourozenců (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 byla průměrná váha *testes*  $119,8 \pm 10,8$  mg a průměrný počet spermií  $20,64 \pm 3,4$  mil/ml. Výsledky ze starších samců ať již mutantních, nebo nemutantních, jsou ve shodě s výsledky z dřívější studie (BHATTACHARYA *et al.* 2014). Moje práce tak mimo jiné dokumentuje fenotypové rozdíly (váhy *testes* a počtu spermií) hybridů v závislosti

na věku. Obě skupiny ať mutantní, nebo nemutantní se chovaly totožně a nelze usuzovat, že rozdíl je způsoben *Hstx2*, nýbrž věkem samců.

Analýza meiotické profáze u mutantních hybridů a jejich nemutantních hybridních sourozenců neodhalila ani změny v zastoupení stádií profáze meiózy I, ani snížení abnormalit ve spermatocytech. Procentuální zastoupení středních a pozdních H1t pozitivních pachytene bylo podobné jak u (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1, tak i u kontrolních samců (u mutantních hybridů: průměrný počet H1t pozitivních pachytenních spermatocytů byl 35,98 % ± 8,39 %, u kontrol: 32,01 % ± 7,62 %). U (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 nebyl výrazně zvýšen počet diplotenních jader oproti kontrolním samcům (u mutantních samců průměrný počet diplotenních jader byl 20,03 % ± 5,46 %). U kontrolních samců pak 16,26 % ± 11,9 %. Jeden samec (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 (ID: 28804) vykazoval výrazné snížení počtu diplotenních jader, což se projevilo na aritmetickém průměru i na směrodatné odchylce. Průměrný počet abnormálních pachytenních H1t pozitivních jader byl u (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 srovnatelný s počtem průměrného zastoupení abnormalit u nemutantních sourozenců (u mutantních hybridů: 51,2 % ± 16,26 %, u kontrol: 53,75 % ± 10,87 %). Oproti tomu ve studii Bhattacharya a kolegů bylo procentuální zastoupení asynapsovaných chromozomů v pachytenních spermatocytech 32,5 % (BHATTACHARYA *et al.* 2013). Ti však ve své práci používali jiné markery pro identifikaci asynapsí (SYCP3, HORMAD2 a CEN). Tyto markery jim neumožnili od sebe identifikovat jednotlivá substádia spermatocytů. Tento důvod a navíc i subjektivita při vyhodnocování mohly způsobit pozorované rozdíly mezi mou prací a dřívější studií.

Analýza spermatogeneze a spermiogeneze byla provedena mimo jiné i na histologických řezech. Oproti B6N, dochází u hybridních samců ke snížení počtu kanálků obsahujících dva typy spermatid a to i těch, které obsahují elongované spermatidy s bičíkem. U B6N bylo poměrné zastoupení kanálků s dvěma typy spermatid (elongované a kulaté) 73,55 ± 8,55 %, oproti tomu u hybridů (B6N.*Fmr1nb*<sup>wt</sup> x PWD)F1 dochází ke snížení počtu těchto kanálků na hodnotu 57,02 % ± 4,27 %. U B6N bylo poměrné zastoupení kanálků s dvěma typy spermatid, přičemž elongované spermatidy měly již vytvořený bičík, (22,7 % ± 3,25 %). U hybridů docházelo k dramatickému snížení tohoto typu kanálku na pouhých 5,71 % ± 0,75 % a naopak docházelo k nárůstu počtu kanálků s jedním typem spermatid a to na hodnotu 40,74 % ± 4,87 % (u B6N bylo průměrné zastoupení kanálku s jedním typem spermatid: 25,43 % ± 9,99 %) a tyto data korelovala s nižší vahou *testes* a počtem spermií u hybridů. Tato

práce tak přispěla i ke zdokumentování průběhu spermiogeneze u hybridních samců ve srovnání s B6N, které doposud nebylo v naší laboratoři vytvořeno.

Ani na histologických řezech nebyl pozorován rozdíl mezi mutantními hybridy a jejich sourozenci. Nedošlo k nárůstu počtu kanálků obsahujících elongované spermatidy s bičkem (eSb) (počet kanálků s eSb:  $5,43 \% \pm 3,45 \%$ ). Což vzájemně potvrzují naměřená a napočítaná data váhy *testes* a počtu spermií u (B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1. V obou testovaných skupinách byly přítomny patologické kanálky a to jak kanálky obsahující „pseudovakuolu“ (potrhání lumen v důsledku apoptózy), tak i apoptotické buňky. V malém počtu byly v obou skupinách přítomny i patologické kanálky se zástavou spermatogeneze ve spermatogoniích nebo spermatocytech (pro mutantní hybridy  $7,75 \% \pm 1,38 \%$ , pro kontroly (nemutantní sourozence)  $2,24 \% \pm 0,75 \%$ ).

Ačkoliv předložená data v mé práci nepodpořila hypotézu, že gen *Fmr1nb* je genem *Hstx2* nebo proteinem s funkcí pachytenního kontrolního bodu, nemůže být zatím tato hypotéza zamítnuta. Je stále nutné otestovat inaktivovanou alelickou formu *Fmr1nb*<sup>PWD</sup> v křížení u (B6J.ChrX.1s.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1, které nám umožní definitivně vyvrátit nebo potvrdit identitu *Fmr1nb* s *Hstx2*.

## 7 Závěr

**Prvním cílem mé diplomové práce bylo určit, zdali ovlivní delece jednoho z kandidátních genů *Hstx1/Hstx2* - genu *Fmr1nb* v oblasti start kodonu ATG průběh samčí meiózy a spermiogeneze.**

Na základě analýzy mých dat lze konstatovat, že u B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> byla vyšší frekvence spermií s abnormální morfologií oproti kontrolním samcům čistého inbredního kmene B6N. Jedná se o podobný fenotyp, jaký byl již popsán pro *Hstx1* u konzomického kmene B6-X<sup>PWD</sup>Y<sup>B6</sup>. Samci byli ale i přes vyšší procento abnormalit plodní. Je však možné, že pro plnou manifestaci abnormální morfologie spermií je zapotřebí interakce s dalším lokusem v proximální části chromozomu X. Ostatní parametry fertility – váha *testes*, relativní váha *testes* a počet spermií nebyly signifikantně rozdílné oproti kontrolním samcům. Podobně ani průběh meiózy I nebyl narušen delecí genu *Fmr1nb*.

**Druhým cílem mé diplomové práce bylo určit, zdali delece genu *Fmr1nb* bude mít vliv na průběh meiózy a spermiogeneze u hybridních samců B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1,**

Na základě předložených dat nedošlo k výraznému ovlivnění ani průběhu meiózy I, ani spermiogeneze u hybridních samců nesoucí delecí genu *Fmr1nb* v porovnání s jejich nemutantními sourozenci. Pro definitivní vyloučení nebo potvrzení identity genu *Fmr1nb* s genem *Hstx2* budou připraveni hybridní samci, kteří ponesou *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> a delecí alely PWD genu *Fmr1nb*. Pokud by *Fmr1nb* byl skutečně genem *Hstx2* lze očekávat, že by u samců došlo k obnově fertility

## 8 Přehled literatury:

1. Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2003). Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *24*, 117-129.
2. Baker, C. L., Kajita, S., Walker, M., Saxl R. L., Raghupathy N., Choi K., Petkov, P. M., and Paigen, K. (2014). PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome research*, *24*, 724-732.
3. Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., and De Massy, B. (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science*, *327*, 836-840.
4. Baudat, F., Imai, Y., and de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature Reviews Genetics*, *14*, 794-806.
5. Bhattacharyya, T., Gregorova, S., Mihola, O., Anger, M., Sebestova, J., Denny, P., Simecek P., and Forejt, J. (2013). Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*, 468-477.
6. Bhattacharyya, T., Reifova, R., Gregorova, S., Simecek, P., Gergelits, V., Mistrik, M., Martincova, I., Pialek, J., and Forejt, J. (2014). X chromosome control of meiotic chromosome synapsis in mouse inter-subspecific hybrids. *PLoS genetics*, *10*, e1004088.
7. Birtle, Z., and Ponting, C. P. (2006). Meisetz and the birth of the KRAB motif. *Bioinformatics*, *22*, 2841-2845.
8. Borsani, G., Tonlorenzi, R., Simmler, M. C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Grompe, M., Pizzuti, A., Muzny, D., Ballabio, A. *et al.* (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature*, *351*, 325-329.
9. Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R. D., and Petukhova, G. V. (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature*, *485*, 642-645.
10. Buard, J., Barthès, P., Grey, C., and de Massy, B. (2009). Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *The EMBO journal*, *28*, 2616-2624.
11. Campbell, P., Good, J. M., and Nachman, M. W. (2013). Meiotic sex chromosome inactivation is disrupted in sterile hybrid male house mice. *Genetics*, *193*, 819-828.
12. Cappell, K. M., Sinnott, R., Taus, P., Maxfield, K., Scarbrough, M., and Whitehurst, A. W. (2012). Multiple cancer testis antigens function to support tumor cell mitotic fidelity. *Molecular and cellular biology*, *32*, 4131-4140.
13. Cohen, P. E., and Holloway, J. K. (2010). Predicting gene networks in human oocyte meiosis. *Biology of reproduction*, *82*, 469-472.
14. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*, 819-823.
15. Coyne, J. A. (1985). The genetic basis of Haldane's rule. *Nature*, *355*, 736-738.
16. Coyne, J. A. and Orr, H. A. (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *353*, 287-305.

17. Coyne, J. A., and Orr, H. A. (1989). Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution*, *43*, 362-381.
18. Coyne, J.A. and Orr, H.A.(2004). *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
19. Charlesworth, B., Coyne, J. A., and Barton, N. H. (1987). The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *American Naturalist*, *130*, 113-146.
20. Dobzhansky, T. (1937) *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York
21. Dzur-Gejdosova, M., Simecek, P., Gregorova, S., Bhattacharyya, T., and Forejt, J. (2012). Dissecting the genetic architecture of F1 hybrid sterility in house mice. *Evolution*, *66*, 3321-3335.
22. Flachs, P., Bhattacharyya, T., Mihola, O., Piálek, J., Forejt, J., and Trachtulec, Z. (2014). Prdm9 Incompatibility Controls Oligospermia and Delayed Fertility but No Selfish Transmission in Mouse Intersubspecific Hybrids. *PloS one*, *9*, e95806.
23. Flachs, P., Mihola, O., Šimeček, P., Gregorová, S., Schimenti, J. C., Matsui, Y., Baudat, F., de Massy, B., Pialek, J., Forejt, J., and Trachtulec, Z. (2012). Interallelic and intergenic incompatibilities of the Prdm9 (*Hst1*) gene in mouse hybrid sterility. *PLoS genetics*, *8*, e1003044.
24. Forejt, J. (1996). Hybrid sterility in the mouse. *Trends Genet*, *12*, 412–417.
25. Forejt, J., and Ivanyi, P. (1974). Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). *Genetical research*, *24*, 189-206.
26. Forejt, J., Vincek, V., Klein, J., Lehrach, H., and Loudová-Micková, M. (1991). Genetic mapping of the t-complex region on mouse chromosome 17 including the Hybrid sterility-1 gene. *Mammalian Genome*, *1*, 84-91.
27. Gecz, J., Gedeon, A. K., Sutherland, G. R., and Mulley, J. C. (1996). Identification of the gene *FMR2*, associated with FRAXE mental retardation. *Nature genetics*, *13*, 105-108.
28. Geraldes, A., Basset, P., Gibson, B., Smith, K. L., Harr, B., YU, H. T. and Nachman, M. W. (2008). Inferring the history of speciation in house mice from autosomal, X-linked, Y-linked and mitochondrial genes. *Molecular Ecology*, *17*, 5349-5363.
29. Geraldes, A., Basset, P., Smith, K. L., and Nachman, M. W. (2011). Higher differentiation among subspecies of the house mouse (*Mus musculus*) in genomic regions with low recombination. *Molecular ecology*, *20*, 4722-4736.
30. Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Rothberg, J. M. *et al.* (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, *302*, 1727-1736.
31. Good, J. M., Dean, M. D., and Nachman, M. W. (2008b). A complex genetic basis to X-linked hybrid male sterility between two species of house mice. *Genetics*, *179*, 2213-2228.
32. Good, J. M., Giger, T., Dean, M. D., and Nachman, M. W. (2010). Widespread over-expression of the X chromosome in sterile F1 hybrid mice. *PLoS genetics*, *6*, e1001148.
33. Good, J. M., Handel, M. A., and Nachman, M. W. (2008a). Asymmetry and polymorphism of hybrid male sterility during the early stages of speciation in house mice. *Evolution*, *62*, 50-65.
34. Gregorová, S., and Forejt, J. (2000). PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies – a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biol (Praha)*, *46*, 31-41.
35. Gregorová, S., Divina, P., Storchova, R., Trachtulec, Z., Fotopulosova, V., Svenson, K. L., Donahue, L.R., Paigen, B. and Forejt, J. (2008). Mouse consomic strains:

- exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies. *Genome research*, 18, 509-515.
36. Gregorova, S., Mňuková-Fajdelová, M., Trachtulec, Z., Čapková, J., Loudova, M., Hoglund, M., Hamvas, R., Lehrach, H., Vincek, V., Klein, J. and Forejt, J. (1996). Sub-milliMorgan map of the proximal part of mouse Chromosome 17 including the hybrid sterility 1 gene. *Mammalian Genome*, 7, 107-113.
  37. Grey, C., Barthès, P., Chauveau-Le Friec, G., Langa, F., Baudat, F., and De Massy, B. (2011). Mouse PRDM9 DNA-binding specificity determines sites of histone H3 lysine 4 trimethylation for initiation of meiotic recombination. *PLoS biology*, 9, e1001176.
  38. Grey, C., Baudat, F., and De Massy, B. (2009) Genome-Wide Control of the Distribution of Meiotic Recombination. *PLoS Biology*, 7, 327-339.
  39. Gu, Y., and Nelson, D. L. (2002). FMR2 function: insight from a mouse knockout model. *Cytogenetic and genome research*, 100, 129-139.
  40. Haldane, J. B. (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of genetics*, 12, 101-109.
  41. Hayashi, K., Yoshida, K., and Matsui, Y. (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature*, 438, 374-378.
  42. Hemminger, J. A., Toland, A. E., Scharschmidt, T. J., Mayerson, J. L., Guttridge, D. C., and Iwenofu, O. H. (2014). Expression of cancer-testis antigens MAGEA1, MAGEA3, ACRBP, PRAME, SSX2, and CTAG2 in myxoid and round cell liposarcoma. *Modern Pathology*, 27, 1238-1245.
  43. Hollocher, H., and Wu, C. I. (1996). The genetics of reproductive isolation in the *Drosophila simulans* clade: X vs. autosomal effects and male vs. female effects. *Genetics*, 143, 1243-1255.
  44. Homolka, D., Ivanek, R., Capkova, J., Jansa, P., and Forejt, J. (2007), Chromosomal rearrangement interferes with Meiotic X chromosome inactivation. *Genome Research*, 17, 1431-1437.
  45. Homolka, D., Jansa, P., and Forejt, J. (2012). Genetically enhanced asynapsis of autosomal chromatin promotes transcriptional dysregulation and meiotic failure. *Chromosoma*, 121, 91-104.
  46. Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M., and Zhang, G. Z. (2011). Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of physiology and biochemistry*, 67, 129-139
  47. Janoušek V., Wang L., Luzynski K., Dufková P., Mrkvicová-Vyskočilová M., Nachman M. W., Munclinger P., Macholán M., Piálek J., Tucker P. K. (2012). Genome-wide architecture of reproductive isolation in a naturally occurring hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *M. m. domesticus*, *Molecular Ecology*, 21, 3032-3047.
  48. Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research*, 15, 8125-8148.
  49. Luetkens, T., Cao, Y., Bartels, K., Meyer, S., Bokemeyer, C., and Atanackovic, D. (2010, May). Expression of the cancer-testis antigen FMR1NB on the surface of malignant cells. In *ASCO Annual Meeting Proceedings* (Vol. 28, No. 15\_suppl, p. e13045).
  50. Macholán, M., Baird, S. J., Munclinger, P., Dufková, P., Bímová, B., and Piálek, J. (2008). Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the mouse hybrid zone? *BMC Evolutionary Biology*, 8, 271.



51. Macholán M., Munclinger P., Sugerkova M., Dufkova P., Bimova B., Bozikova E., Zima J., Pialek J. (2007). Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution*, *61*, 746–771.
52. Margolin, G., Khil, P. P., Kim, J., Bellani, M. A., and Camerini-Otero, R. D. (2014). Integrated transcriptome analysis of mouse spermatogenesis. *BMC genomics*, *15*, 39.
53. Masly, J. P., Jones, C. D., Noor, M. A., Locke, J., and Orr, H. A. (2006). Gene transposition as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. *Science*, *313*, 1448-1450.
54. Mayr, E. (1963). *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
55. Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J. C., and Forejt, J. (2009). A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science*, *323*, 373-375.
56. Muller, H. J. (1940). Bearing of the *Drosophila* work on systematics. In: Huxley, J.S. (Ed.), *The New systematics*. Clarendon Press, Oxford, pp. 185-268.
57. Oka, A., Mita, A., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Takagi, N., Takano-Shimizu, T., Toshimori, K., Moriwaki, K. and Shiroishi, T. (2004). Hybrid breakdown caused by substitution of the X chromosome between two mouse subspecies. *Genetics*, *166*, 913-924.
58. Oliver, P. L., Goodstadt, L., Bayes, J. J., Birtle, Z., Roach, K. C., Phadnis, N., Beatson, S.A., Lunter, G., Malik, H.S., and Ponting, C. P. (2009). Accelerated evolution of the *Prdm9* speciation gene across diverse metazoan taxa. *PLoS genetics*, *5*, e1000753.
59. Orr, H. A. (1993). Haldane's rule has multiple genetic cause, *Nature*, *361*, 532-533.
60. Orr, H. A., and Irving, S. (2001). Complex epistasis and the genetic basis of hybrid sterility in the *Drosophila pseudoobscura* Bogota-USA hybridization. *Genetics*, *158*, 1089-1100.
61. Parvanov, E. D., Ng, S. H., Petkov, P. M., and Paigen, K. (2009) Trans-Regulation of Mouse Meiotic Recombination Hotspots by *Rcr1*. *Plos Biology*, *7*, 340-349.
62. Parvanov, E. D., Petkov, P. M., and Paigen, K. (2010). *Prdm9* controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science*, *327*, 835-835.
63. Perez, D. E., and Wu, C. I. (1995). Further characterization of the Odysseus locus of hybrid sterility in *Drosophila*: one gene is not enough. *Genetics*, *140*, 201-206.
64. Phadnis, N., and Orr, H. A. (2009). A single gene causes both male sterility and segregation distortion in *Drosophila* hybrids. *Science*, *323*, 376-379.
65. Piálek, J., Hauffe, H. C., and Searle, J. B. (2005). Chromosomal variation in the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society*, *84*, 535-563.
66. Piálek, J., Hauffe, H. C., Rodríguez-Clark, K. M., and Searle, J. B. (2001). Racialization and speciation in house mice from the Alps: the role of chromosomes. *Molecular Ecology*, *10*, 613-625.
67. Presgraves, D. C. (2002). Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. *Evolution*, *56*, 1168-1183.
68. Proenca, C. C., Gao, K. P., Shmelkov, S. V., Rafii, S., and Lee, F. S. (2011). *Slitrks* as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. *Trends in neurosciences*, *34*, 143-153.
69. Rieseberg, L.H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, *16*, 351–358.
70. Rieseberg, L.H., Willis, J.H. (2007). Plant speciation. *Science*, *317*, 910-914.
71. Roeder, G. S., and Bailis, J. M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends in genetics*, *16*, 395-403.

72. Schwikowski, B., Uetz, P., and Fields, S. (2000). A network of protein–protein interactions in yeast. *Nature biotechnology*, *18*, 1257-1261.
73. Simon, M. M., Greenaway, S., White, J. K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Rozman, J. *et al.* (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome biology*, *14*, R82.
74. Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., and Old, L. J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *5*, 615-62
75. Song, R., Ro, S., Michaels, J. D., Park, C., McCarrey, J. R., and Yan, W. (2009). Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nature genetics*, *41*, 488-493.
76. Storchova, R., Gregorová, S., Buckiova, D., Kyselova, V., Divina, P., and Forejt, J. (2004). Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mammalian Genome*, *15*, 515-524
77. Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., and Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, *123*, 1213-1226.
78. Tamanini, F., Willemsen, R., van Unen, L., Bontekoe, C., Galjaard, H., Oostra, B. A., and Hoogeveen, A. T. (1997). Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. *Human molecular genetics*, *6*, 1315-1322.
79. Tao, Y., Chen, S., Hartl, D. L., and Laurie, C. C. (2003). Genetic dissection of hybrid incompatibilities between *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. I. Differential accumulation of hybrid male sterility effects on the X and autosomes. *Genetics*, *164*, 1383-1398.
80. Ting, C. T., Tsaar, S. C., Wu, M. L., and Wu, C. I. (1998). A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science*, *282*, 1501-1504
81. Trachtulec, Z., Mňuková-Fajdelová, M., Hamvas, R. M., Gregorová, S., Mayer, W. E., Lehrach, H. R., and Klein, J. (1997). Isolation of candidate hybrid sterility 1 genes by cDNA selection in a 1.1 megabase pair region on mouse chromosome 17. *Mammalian genome*, *8*, 312-316.
82. Trachtulec, Z., Vlcek, C., Mihola, O., Gregorová, S., Fotopulosová, V., and Forejt, J. (2008). Fine haplotype structure of a chromosome 17 region in the laboratory and wild mouse. *Genetics*, *178*, 1777-1784.
83. True, J. R., Weir, B. S., and Laurie, C. C. (1996). A genome-wide survey of hybrid incompatibility factors by the introgression of marked segments of *Drosophila mauritiana* chromosomes into *Drosophila simulans*. *Genetics*, *142*, 819-837.
84. Turelli, M., and Begun, D. J. (1997). Haldane's rule and X-chromosome size in *Drosophila*. *Genetics*, *147*, 1799-1815.
85. Turner, J. M. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*, *134*, 1823-1831.
86. Turner, J. M. A., Aprelikova, O., Xu, X., Wang, R., Kim, S., Chandramouli, G. V., Barrett, J.C., Burgoyne, P.S, and Deng, C. X. (2004). BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Current Biology*, *14*, 2135-2142.
87. Turner, J. M. A., Mahadevaiah, S. K., Elliott, D. J., Garchon, H. J., Pehrson, J. R., Jaenisch, R., and Burgoyne, P. S. (2002). Meiotic sex chromosome inactivation in male mice with targeted disruptions of Xist. *Journal of Cell Science*, *115*, 4097-4105.
88. Turner, L. M., and Harr, B. (2014). Genome-wide mapping in a house mouse hybrid zone reveals hybrid sterility loci and Dobzhansky-Muller interactions. *eLife*, *3*, e02504.

89. Turner, L. M., White, M. A., Tautz, D., and Payseur, B. A. (2014). Genomic networks of hybrid sterility. *PLoS genetics*, *10*, e1004162.
90. Turner, G., Webb, T., Wake, S. and Robinson, H. (1996) The prevalence of the fragile X syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *64*, 196–197
91. Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Warren, S. T. *et al.* (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, *65*, 905-914.
92. Wefers, B., Meyer, M., Ortiz, O., de Angelis, M. H., Hansen, J., Wurst, W., and Kühn, R. (2013). Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*, 3782-3787.
93. White, M. A., Steffy, B., Wiltshire, T., and Payseur, B. A. (2011). Genetic dissection of a key reproductive barrier between nascent species of house mice. *Genetics*, *189*, 289-304.
94. Wu, C. I., and Davis, A. W. (1993). Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *American Naturalist*, *142*, 187-212.
95. Zur, H., and Tuller, T. (2013). New universal rules of eukaryotic translation initiation fidelity. *PLoS computational biology*, *9*, e1003136.

## 9 Přílohy

**Příloha 1. Souhrnná tabulka aritmetických průměrů parametrů fertility u čistých inbredních kmenů, parciálních sukonzomických kmenů, u mutantních linií B6N.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> a hybridních samců (B6.*Fmr1nb*<sup>mut</sup> x PWD)F1 a jejich nemutatních sourozenců.**

# značí věk 8 - 14 týdnů, ## věk starší 14 týdnů, \* věk 8-9 týdnů, \*\* věk 19-20. Tučně jsou vyznačeny významné hodnoty.

genotyp/křížení	počet samců	váha testes ± SD [mg]	počet spermií ± SD [mil/ml]	celková malformace spermií ± SD [%]
<b>C57Bl/6N</b>	20	186,8 ± 22,3	76,5 ± 24	<b>21 ± 5</b>
<b>C57Bl/6N<sup>#</sup></b>	9	180 ± 16,8	70,2 ± 17,5	20 ± 4,2
<b>C57Bl/6N<sup>##</sup></b>	11	192,4 ± 25,4	81,6 ± 28	23 ± 4,5
<b>C57Bl/6J</b>	2	192 ± 1,41	79,6 ± 8,8	<b>12 ± 0,71</b>
<b>PWD</b>	3	118,3 ± 3,8	34 ± 14,3	2 ± 1
<b>B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>mut</sup></b>	21	183 ± 31	71,3 ± 24,8	<b>33 ± 7,6</b>
<b>B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>mut</sup><sup>#</sup></b>	10	165,5 ± 22,1	54,5 ± 18,2	33 ± 8,59
<b>B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>mut</sup><sup>##</sup></b>	11	200 ± 29,49	86,5 ± 19,9	33 ± 7,1
<b>B6J.PWD –Chr X.1</b>	2	<b>196 ± 16,97</b>	<b>86,5 ± 0,71</b>	<b>12 ± 2,12</b>
<b>B6J.PWD -Chr X.2</b>	2	<b>169,5 ± 4,95</b>	<b>49,5 ± 8,84</b>	<b>54 ± 5,66</b>
<b>B6J.PWD -Chr X.1s</b>	2	<b>160,5 ± 6,36</b>	<b>40,5 ± 7,42</b>	<b>54 ± 12,73</b>
<b>(B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>mut</sup> xPWD)F1</b>	11	90,9 ± 15,8	6,91 ± 7,54	45 ± 9
<b>(B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>wt</sup> xPWD)F1</b>	14	95,6 ± 20,2	9,3 ± 9,2	47 ± 8
<b>(B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>mut</sup> xPWD)F1*</b>	8	82,5 ± 7,6	2,7 ± 2,8	45 ± 9
<b>(B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>wt</sup> xPWD)F1*</b>	9	82,2 ± 8,2	2,9 ± 3,8	47 ± 8
<b>(B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>mut</sup> xPWD)F1**</b>	3	113,2 ± 3,8	18,1 ± 0,8	/
<b>(B6N.<i>Fmr1nb</i><sup>wt</sup> xPWD)F1**</b>	5	119,8 ± 10,8	20,64 ± 3,4	/